

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin der
Philipps-Universität Marburg
Abteilung für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. D. B. Jones

**Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Paxillin
in ATP- und Bradykinin-stimulierten primären bovinen
Osteoblasten**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

vorgelegt von Ann-Sophie Luise Silber
aus Speyer
Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

15.04.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. D. B. Jones

Korreferent 1: Prof. Dr. G. Schratt

Korreferent 2: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	13
2.1	Materialien.....	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Zellen	14
2.1.3	Kulturmedien	14
2.1.4	Aktivatoren.....	16
2.1.5	Sondermaterialien	16
2.1.6	Plasmide.....	16
2.1.7	Apparaturen und Programme.....	17
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Traction Force - Zugkraftanalyse	23
2.2.3	Immunzytochemischer Paxillin-Nachweis	25
2.2.4	Stimulation von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB mit ATP oder Bradykinin	26
2.2.5	Fluoreszenzmessungen an ATP-induzierten Paxillin-Clustern	27
2.2.6	Totale-Interne-Reflexionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRF).....	27
2.2.7	Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP)	28
2.2.8	Kalziummessungen	29
2.2.9	Statistische Analyse	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Traction-Force-Messungen in eGFP-Paxillin-exprimierenden Osteoblasten	33
3.2	Intrazelluläre Lokalisation von Paxillin in pOB	38
3.3	Fluorescence recovery after photo-bleaching – FRAP	39
3.4	ATP-Stimulation von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB.....	40
3.5	Paxillin-Umverteilung in Bradykinin-stimulierten pOB	49
3.6	Analyse der Kalziumkonzentration in pOB bei Stimulation.....	55
4	DISKUSSION	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG - ABSTRACT.....	98
7	LITERATURANGABEN	99

8	ANHANG	120
8.1	Abkürzungsverzeichnis	120
8.2	Tabellarischer Lebenslauf	125
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	126
8.4	Danksagung	127
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	128

1 Einleitung

Ein funktionierendes System ist bekanntlich mehr als die Summe seiner Teile (nach Aristoteles¹). Das Verständnis der einzelnen Bestandteile eines Systems ist jedoch essentiell, um deren Zusammenwirken zu verstehen. Das Knochen-system, ein komplexes adaptives System, wird bis heute hinsichtlich seiner Funktionsbausteine intensiv untersucht. Knochengewebe gewährleistet die Skelettstabilität, zeichnet sich aber zusätzlich durch seine Adaptivität auf Stimuli aus. Dies lässt sich über multiple, ineinander greifende Strukturen verschiedener Funktionsebenen erklären. Auf zellulärer Ebene verleiht das Zytoskelett den Knochenzellen diese Struktur und Anpassungsfähigkeit. Ein Strukturelement im Zytoskelett sind fokale Adhäsionen, von deren Erforschung man sich Erklärungsmodelle für Zellmotilität, Gewebsplastizität sowie für morphologische und metabolische Adaptivität von Knochengewebe verspricht. Die Dynamik des Zytoskeletts und intrazellulärer Signalkaskaden von Knochenzellen wurden aus naheliegenden Gründen besonders im Kontext mechanischer Stimulation erforscht. Des Weiteren findet eine biochemische Stimulation durch extrazelluläre Signalmoleküle statt, welche die Zytoarchitektur und Anpassungsmechanismen von Knochenzellen ebenfalls beeinflusst. Knochen bildet als harte Bindegewebsart das Skelett der Wirbeltiere und dient so der Statik und Formgebung. Mit Hilfe von Muskeln, Bändern, Sehnen und Gelenken ist Knochen im Bewegungsapparat instrumental für Kraftübertragung und Fortbewegung, dient aber auch dem Schutz innerer Organe und fungiert im Mineralstoffwechsel als dynamisches Kalzium-Reservoir. Histologisch besteht Knochengewebe aus Knochenzellen, eingebettet in die extrazelluläre Knochenmatrix. Diese besteht zu 35 % aus organischer Substanz und zu 65 % aus anorganischem Hydroxylapatit. Der organische Anteil besteht überwiegend aus Kollagen Typ I, das die extrazelluläre Matrix (EZM) strukturiert, und aus Nicht-Kollagen-Proteinen, wie Proteoglykanen

¹ "Das was aus Bestandteilen so zusammengesetzt ist, dass es ein einheitliches Ganzes bildet, nicht nach Art eines Haufens, sondern wie eine Silbe, das ist offenbar mehr als bloß die Summe seiner Bestandteile." - Aristoteles, Metaphysik 1041 b 10 (VII. Buch (Z))

[233]. Zu den Knochenzellen zählen die Osteoprogenitorzellen, die von mesenchymalen Stammzellen abstammen. Über die Präosteoblasten-Stufe entwickeln sich unter Einfluss von Glukokortikoiden und knochenmorphologischen Proteinen (BMP) aus den Progenitorzellen primäre und reife Osteoblasten, welche die organische Knochenmatrix synthetisieren und eine Mineralisierung bewirken.

In dieser Arbeit wurden primäre Osteoblasten (pOB) untersucht. POB liegen nahe der Knochenoberfläche in einer Schicht unterhalb reifer Osteoblasten, sind elliptisch geformt und haben Differenzierungspotenzial [57]. Oberflächlich liegende, inaktive Osteoblasten werden Saumzellen genannt. Bei Osteozyten handelt es sich um terminal differenzierte Osteoblasten, die zwar in die Knochenmatrix eingebettet, an deren Produktion aber nicht mehr beteiligt sind [102]. Sie kommunizieren über Zellausläufer in den Canaliculi der Knochenmatrix [119]. Osteoklasten stammen aus der hämatopoetischen Linie und dienen der Knochenresorption, indem die primär uninukleären Zellen im Resorptionskompartiment zu multinukleären Synzytien fusionieren [47].

Knochen zeichnet sich durch seine Stabilität und praktische Leichtbauweise aus, zeigt aber zudem dynamisches Anpassungsvermögen durch lokalen Gewebsumbau und reagiert so auf externe Stimuli. Dies dient nicht nur der Kalziumhomöostase und dem ossären Heilungsvermögen, sondern auch der effizienten Formanpassung an die mechanischen Hauptbelastung [27]. Das dazu nötige Knochen-Remodeling wird einerseits mechanisch und andererseits biochemisch reguliert [152]. Parathormon (PTH) wirkt endokrin auf die Kalziumhomöostase des Knochens. Es wird aus der Nebenschilddrüse bei Hypokalzämie ins Blut sezerniert und bewirkt neben einer verstärkten Rückresorption von Kalzium in Niere und Dünndarm die Mobilisierung von Kalzium aus Knochen. Osteoklasten sezernieren daraufhin Osteoid-abbauende Enzyme. Außerdem wird die parakrine Sekretion bzw. Präsentation von Osteoklasten-stimulierenden Zytokinen induziert, wie z.B. der Rezeptoraktivator des NFκB-Liganden (RANKL) [28]. Dies führt zur Osteoidresorption und Kalzium-Freisetzung. Als PTH-Antagonist fungiert das von den C-Zellen der Schilddrüse sezernierte

Calcitonin, das bei Hyperkalziämie den Kalziumspiegel normalisiert, indem es Osteoklastenaktivität direkt herunterreguliert [40]. Sexualhormone und Glukokortikoide beeinflussen über intrazelluläre Rezeptoren ebenfalls den Knochenstoffwechsel: Östrogene besitzen anti-osteoporotische Wirkung, da sie u.a. die Expression von proresorptiven Zytokinen inhibieren, während Glukokortikoide zur vermehrten Knochenresorption und zur Unterdrückung der Knochenneubildung führen [103]. Sie hemmen Osteoblastenbildung und -aktivität, steigern deren Apoptoserate bei verlängerter Osteoklastenlebenszeit und intensivieren den RANKL-Signalweg, was *summa summarum* zu einer Entmineralisierung und Knochengewebsverlust führt. Ferner haben lokale Zytokine Einfluss auf die Knochenresorption: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), -6, -11, -15 und -17 wirken proresorptiv; IL-4, -10, -13 oder Interferon- γ (IFN- γ) hemmen die Knochenresorption [141]. Außerdem beeinflussen lokale Entzündungsmediatoren und interzellulären Kontakte das Remodeling und die Zelladaptivität [111].

Seit dem 19. Jahrhundert werden die Effekte von mechanischer Belastung auf das Knochen-Remodeling untersucht. Das sogenannte Wolff'sche-Gesetz [227] und das Mechanostat-Modell [73, 74, 75] prägten die Aufklärung der Knochenplastizität, die bis heute nicht vollständig verstanden ist. Bei Knochenbelastung kommt es über lokale Deformation an Stellen maximaler Krafteinwirkung zur Adaptation der Gewebssteifigkeit. Knochenmasse, -geometrie und -stärke passen sich so lebenslang der Körperbewegung und Belastung an. Remodeling setzt sich aus der hochregulierten Abfolge von Zell-Aktivierung, Knochenresorption und Knochenneubildung zusammen [169]. Der Knochenabbau durch Resorption der Knochenmatrix ist Aufgabe der Osteoklasten. Zur Neubildung von Knochensubstanz werden Vorläuferzellen zur Differenzierung in Osteoblasten angeregt, die dann an der Knochenoberfläche sekundär mineralisierendes Osteoid bilden. Unter physiologischen Bedingungen bleibt die Knochenmasse durch komplexe Regulation ausbalanciert, ist aber adaptionsfähig [151].

Das Zytoskelett von Knochenzellen dient der räumlichen Organisation; es verbindet die Zellen mechanisch und biochemisch mit ihrer Umgebung und ermöglicht zelluläre Kraftentwicklung für Bewegung und Formveränderung [241]. Das

Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus einem Netzwerk von Mikrotubuli (\varnothing 25 nm), Aktinfilamenten (\varnothing 7 nm) und Intermediärfilamenten (\varnothing 10 nm), die sich in Polarität, Assemblierungsdynamik und Interaktionspartnern unterscheiden [70]. Über zahlreiche Regulations- und Strukturproteine entsteht eine dynamische Architektur von Kopplungsstellen, die der Zelle Reaktionsfähigkeit, innere Stabilität und morphologische Veränderlichkeit gewähren. Vergleichbar mit dem Funktionsprinzip eines knöchernen Skeletts, zeichnet sich das zellstabilisierende Zytoskelett durch seine fortlaufende Dynamik und Anpassung an Umgebungsreize aus [70].

Das Zytoskelett ermöglicht zelluläre Motilität, aber auch Positionierung in und Interaktion mit der EZM. Die dafür essentielle physische Kontaktaufnahme der Zelle mit ihrer Umgebung vermitteln u.a. punktuelle Zell-Matrix-Adhäsionen. Seit ihrer Entdeckung vor über 30 Jahren fasziniert die Struktur- und Funktionsaufklärung solcher fokalen Kontakte [1] und bis heute sind (über) 156 Komponenten und 690 Interaktionsmöglichkeiten dieses Integrin-Adhesomes bekannt [239]. Im zweidimensionalen Zellkultursystem fungieren sie als strukturelle Zell-Anker [71] und dienen *in vitro* und zum Teil auch *in vivo* höchstwahrscheinlich als biochemische und mechanosensorische bidirektionale Schnittstellen zwischen Zelle und Umgebung [178, 189].

Unterschiedliche Typen fokaler Kontakte werden nach Reifegrad, Lokalisation und Proteinzusammensetzung differenziert [242] und können in den jeweils nächsten Typ maturieren [14]: Nach dem aktuellen Forschungsstand unterscheidet man kurzlebige, punktförmige fokale Komplexe, meist am vorderen Teil migrierender Zellen lokalisiert, größere und zeitlich stabilere fokale Adhäsionen und längliche fibrilläre Adhäsionen. Fokale Adhäsionsstrukturen werden im Folgenden hier als FA abgekürzt. Fokale Kontakte basieren strukturell auf transmembranen $\alpha\beta$ -Heterodimeren der nicht-enzymatischen Integrin-Familie, deren extrazelluläre Domänen Bindung mit EZM-Molekülen eingehen. Mit dem zytosomatischen Teil interagieren multiple Strukturproteine und Enzyme, sodass eine Verbindung zum organisierten Aktingerüst entsteht [138]. Der Submembran-

plaque besteht je nach Bedarf aus Integrin-Bindeproteinen wie Talin, Adapterproteinen, wie Vinculin, Paxillin oder Zyxin, und aus Enzymen, wie der FAK-Tyrosinkinase (fokale Adhäsionskinase). Fokale Adhäsionen unterliegen einem komplexen Reifungsprozess und einer nicht vollständig aufgeklärten Dynamik, die von multimodalen extra- und intrazellulären Signalen reguliert wird [138]. Integrin-Clustering bei Kontaktaufnahme zum EZM sowie externe oder interne Kraftwirkung initiieren die Assemblierung von FA, was von Proteinrekrutierung, -strukturänderung, -phosphorylierung sowie der Aktivierung von schalterartigen Signalkaskaden begleitet wird [86]. Im adhärenen Zustand weist die Zelle reife, zeitlich stabile fokale Adhäsionen auf [222], während in motilen und aktivierten Zellen eine gesteigerte Assemblierungs- und Umsatzrate beobachtet wird. Im Migrationsprozess stellt sich die FA-Dynamik komplexer dar: Es kommt zu einem lokal begrenzten FA-Umsatz (turnover), um eine bewegliche Zellregion zu schaffen. Damit sind FA-Neubildungen und deren Reifung in punktuell adhärenen Regionen zwecks Widerlager gemeint sowie die FA-Neubildungen am vorangehenden Zellpol [222] bei zeitgleicher Ablösung des hinteren Zellteils [150]. Eine komplexe Dynamikregulation leuchtet demnach ein. Die Rekrutierung der Kalzium-abhängigen Protease Calpain oder von Mikrotubuli an FA, letzteres u.a. durch das Adapterprotein ZF21, führen zum FA-Abbau [65]. Über die dynamische Verbindung von FA mit F-Aktinbündeln [139] kann intrazellulär generierte Kraft auf FA einwirken, was deren Reifezustand ebenfalls moduliert. Umgekehrt besteht die bis heute viel getestete Hypothese, dass auch extrazelluläre Kraft über die vermutlich mechanosensitiven FA auf das Zytoskelett übertragen werden kann [172, 184]. Über diverse Signalkaskaden, z.B. über ERK (extracellular-signal regulated kinase) oder Rho A, wird die intrazelluläre Kontraktilität über eine Myosin-Phosphorylierung initiiert [222]; lösliche Mediatoren können also eine kraftabhängige FA-Strukturmodulation herbeiführen. Ein besseres Verständnis des Adhesomes könnte klinisch relevante Facetten von Zellbewegung, Metastasierung, Wundheilung, Zelldifferenzierung und Adaptationsverhalten erklären.

Zur Haftung am Untergrund verankern sich Zellen unter anderem über FA in der EZM [189], wobei diese Adhäsion mechanisch durch intrazellulär generierte

Adhäsionszugkraft verstärkt wird. Zugkraft ermöglicht der Zelle neben ihrer Positionierung in der Umgebung eine innere Stabilität und die Möglichkeit zur Fortbewegung. Durch FA-Kopplung mit kontraktile Aktin-Myosin-Bündeln (stress fibers) kann die Zelle Kräfte auf ihre Umgebung ausüben. Mikrotubuli werden eine wichtige Rolle in der Zellstabilisierung zugesprochen, da sie zwar ein dynamisches, aber widerstandsfähiges Grundgerüst durch die Zelle spannen [150]. Die Zelle scheint externe Kräfte, wie Zug, Druck oder Substratrigidität über die mechanosensitiven FA zu detektieren, die solche Informationen über Veränderung der räumlichen Proteinstrukturen in biochemische Signale transformieren, um Zytoskelett und Zellmetabolismus an die externe Situation anzupassen. Fokale Kontakte fungieren vermutlich als ein vermittelndes Element der Mechanotransduktion mit Inside-out- und Outside-in-Signaltransmission.

Mechanotransduktion ist die Gesamtheit von Detektion der mechanischen Aktion (Mechanosensing), Übersetzung biophysikalischer Signale in eine Kette von biochemischen Signalkaskaden und letztlich den mechanischen Reaktionen der Zelle [108, 216]. Die zelluläre Zugkraft kann je nach extrazellulärem Signal, Substrateigenschaften oder intendierter Zellbewegung dynamisch variiert werden, um die Zellhomöostase zu erhalten und entsprechende Prozesse zu beeinflussen [195]. Die Fähigkeit der Zelle Zugkräfte aufzubauen und simultan Adhärenz zu schaffen, ist im Migrationsprozess imperativ und wird in defizienten Modellen deutlich, wo Wundverschluss, Zelldifferenzierung, Zellstabilität und Mobilität bei gestörter Kraftentwicklung herabgesetzt sind. Harris et al. pionierten Methoden der Zugkraftmessung und Quantifizierung [98], die Lee et al. [125] sowie Dembo und Wang [51] weiterentwickelten. In dieser Arbeit wird eine modifizierte Form der Cell-Traction-Force-Analyse (CTF) verwendet (s. Materialien und Methoden). Auf die Ausführung mathematischer und physikalischer Hintergründe wird hier mit Hinweis auf Dissertationen aus dem eigenen Institut verzichtet (Lautenschläger 2007, Curtze 2004).

Das Zytoskelettprotein Paxillin wurde erstmals 1990 in Fibroblasten entdeckt [209]. Basierend auf seiner vermuteten Funktion war der lateinische Begriff

paxillus namensgebend, was Absteckpflock bedeutet. Anfänglich nur als strukturelles FA-Bindeprotein erachtet, wird Paxillin heute als eine Multifunktionschnittstelle anerkannt, mit instrumentalem Einfluss auf FA-Beständigkeit, Zellüberleben, Motilität und Proliferation [48]. Die genauere Erforschung von Paxillin motivierte u.a. erst das wissenschaftliche Interesse an FA. Untersuchungen an Paxillin-negativen Zellen [198] oder Paxillin-modifizierten Zellen zeigten seine Relevanz: es kam zu Letalität, Migrationsversagen [97] und zu großen persistenten FA. Paxillin wurde in unterschiedlichen Mengen und posttranslationalen Modifikationen in allen FA-Reifeformen sowie weniger organisierten Formationen nachgewiesen und soll im Zytoplasma als ungebundene Paxillin-Fraktion vorliegen. Es ist eines der ersten detektierbaren Proteine in naszierenden FA [123], was auf seine Rolle bei der FA-Assemblierung hindeutet [48]. Im FA-Turnover kommt überwiegend phosphoryliertes Paxillin vor, das bei Auflösung der FA im zytoplasmatischen Proteinpool verschwindet, möglicherweise um in FA-Neuformationen recycelt zu werden [123].

Strukturell ist α -Paxillin ein 68-kD großes, konserviertes Adapterprotein aus 559 Aminosäuren ohne enzymatische Aktivität [25, 180]. Es sind drei Paxillin-Isoformen bekannt (α , β und γ), die sich in wenigen Exoninsertionen unterscheiden [25]. Es wurden zwei Paxillin-verwandte Proteine mit Struktur- und Funktionsähnlichkeit entdeckt: Hic-5 und Leukopaxin [135]. Durch Klonierung und Sequenzierung konnte die Proteinstruktur Paxillin aufgeklärt werden [210]: Der Amino-Terminus (N-) mit 5 degenerate-third (LD)-Motiven ist eine Prolin-reiche Region und Dockstation für SH3-Domänen von Interaktionspartnern. Am Carboxy-Terminus (C-) liegen 4 LIM-Motive mit doppelten Zinkfingerdomänen, über die Paxillin an FA rekrutiert wird. Paxillin weist diverse Tyrosin (Y)-, Serin (S)- und Threonin-Phosphorylierungsstellen auf [179] (s. Abb. 1), die die Funktion und die Bindung von Interaktionspartner von Paxillin spezifisch beeinflussen [180].

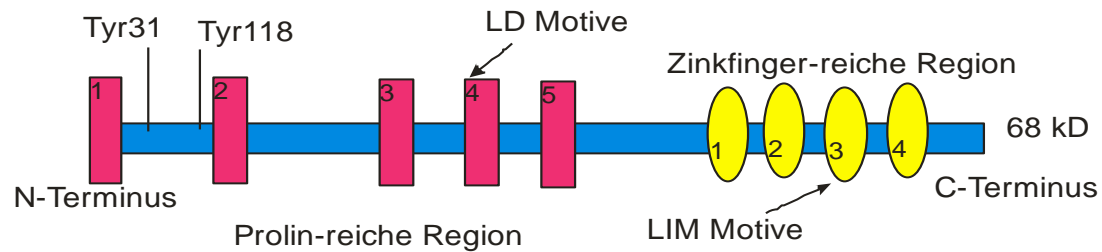


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Paxillin mit wichtigen Strukturmotiven.

Der N-Terminus hat LD-Motive zur Proteininteraktion, Tyrosin 31/118 sind bedeutende Phosphorylierungsstellen. Am C-Terminus liegen 4 LIM-Motive zur Paxillin-Rekrutierung an FA (modifiziert nach [180]).

Paxillin-Interaktionspartner und Downstream-Effekte sind vielfältig und nicht komplett verstanden. LD-Motive rekrutieren Proteine mit einer Paxillin-Binde-Sequenz (PBS), wie z.B. das Aktin-bindende Protein Aktopaxin, das FA-Aktin koppelnde Inulin, Tubulin, FAK, das E6-Onkoprotein und die Phosphatase PTP-Pest. Der Paxillin-FAK-Komplex kann in stabilen FA unphosphoryliert und inaktiv sein, bei Phosphorylierung durch die c-Src-Tyrosinkinase (Src) oder c-jun-Kinase (JNK) jedoch FA-Disassemblierung bewirken. Ob Paxillin direkt an Integrine bindet oder deren Kopplung über einen nicht identifizierten Adapter indirekt entsteht, ist noch nicht gesichert [211].

Paxillin ist das Zielsubstrat diverser Kinasen. Durch Paxillin-Phosphorylierung, z.B. an Tyr-31 und Tyr-118, werden durch Tertiärstruktur-Änderung Bindestellen für weitere Interaktionspartner zugänglich. Paxillin-Phosphorylierung wurde bei Zellstimulation via Wachstumsfaktoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Ephrin-Rezeptoren beobachtet [25]. Die Phosphorylierung der LIM-Domäne sorgt für eine Zielausrichtung von Paxillin (Targeting) hin zu naszierenden FA. Eine Paxillin-Dephosphorylierung wird über die LIM-Region bindende PTP-PEST u.a. durch Zell-Stimulation mit Adrenocorticotropin (ACTH), Ephrin, Insulin, Stickstoffmonoxid (NO) und Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor 1 (insulin-like growth factor, IGF-1) bewirkt, aber auch passiv durch die Inaktivierung der phosphorylierungsinduzierenden Rho A. Auch die Rekrutierung der Kinase Csk erlaubt als Inhibitor der Src-Aktivität eine gewisse Negativkontrolle.

Paxillin reguliert, abhängig von seinem Phosphorylierungszustand, die Aktivität kleiner GTPasen über den Aktivitätszustand deren aktivierenden GEFs (Guanintriphosphat-Austauschfaktoren) und inaktivierenden GAPs (GTPase aktivierende Proteine).

Das Nukleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP), 1929 von Lohmann entdeckt, wirkt durch seine energiereiche Phosphoanhydrid-Bindungen als Treibstoff für energieverbrauchende Zellprozesse [235], fungiert aber auch als intrazelluläres Signalmolekül und als extrazellulärer Mediator [90] mit einer perizellulären Konzentrationen von 10 - 20 μM [11]. Extrazelluläres ATP wirkt über membranständige Purin-Rezeptoren, auch Purinozeptoren genannt [147] und wurde schon früh mit Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und des Zellmetabolismus in Verbindung gebracht [38]. Purinozeptoren werden in G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) und ionotrope P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) unterteilt [63,102]. Ein intrazellulärer Kalziumanstieg wird bei P2Y-Aktivierung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und bei P2X-Aktivierung durch einen Influx von extrazellulären Ionen bewirkt.

Extrazelluläres ATP wirkt nur sehr kurz, da es von Ekto-Nukleotidasen der Zelloberfläche degradiert wird. Gesteigerte extrazelluläre ATP-Konzentrationen werden vor allem bei Entzündungen oder Verletzungen detektiert [76]. Dabei wird ATP über Exozytose, aktive Sekretion durch ABC-Proteine, bei Zytolyse geschädigter Zellen, aus Thrombozyten oder Tumorzellen freigesetzt. In Osteoblasten bewirkt sogar mechanische Stimulation eine ATP-Freisetzung [102] und es ist ein wichtiges Signalmolekül im Knochen-Remodeling. Beide Purinozeptor-Typen konnten auf Knochenzellen nachgewiesen werden [77]. Reifere Osteoblasten haben große zytoplasmatische ATP-Speicher, sodass ATP schnell für auto- und parakrine Effekte mobilisierbar ist [101]. ATP aktiviert Osteoklasten einerseits direkt [234], wirkt aber auch indirekt über Osteoblasten-abhängige Osteoklastenaktivierung [26]. Es wirkt hemmend auf die osteoblastische Knochen-substanzbildung [113], sodass es die Knochenbildung insgesamt negativ reguliert. Diese Inhibition wurde schon bei geringen ATP-Konzentrationen über

P2Y₂-R-Stimulation festgestellt, sodass dieser Rezeptor (R) mit pathologischem Knochenschwund in Verbindung gebracht wurde [101]. Über den P2X₇-R können hohe ATP-Konzentrationen ein sog. Membrane-Blebbing und Zelltod initiieren. Des Weiteren werden mitogene ATP-Effekte auf Präosteoblasten und eine synergistische Wirkung mit Wachstumsfaktoren berichtet: P2-R-Aktivierung bewirkt z.B. eine Src-aktivierende Transaktivierung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) [102]. Die Effekte von ATP auf die Zellhomöostase im Knochen sind komplex [29] und unser Verständnis davon limitiert. Es wurde zwar mit gesteigertem Migrationsverhalten assoziiert [62], die dafür nötigen Veränderungen einzelner Komponenten der Adhärenz-Maschinerie sind jedoch noch wenig untersucht.

Im Entzündungsgeschehen katalysieren Kallikreine die Freisetzung von Kininen, wie dem Nonapeptid Bradykinin, aus leberproduzierten hochmolekularen Kininogenen. Mit ihrer vasoaktiven Eigenschaft sind sie an der kardiovaskulären Homöostase sowie der Schmerz- und Entzündungsreaktion beteiligt. Bradykinin (B) wurde 1948 von Rocha e Silva identifiziert. Es aktiviert den B1-Rezeptor auf der Zelloberfläche, der insgesamt eher schwächer exprimiert ist, aber durch Inflammation hochreguliert werden kann, sowie den von vielen Zellen konstitutiv exprimierten B2-Rezeptor [24]. B-Rezeptoren sind GPCR, die über G α i/q Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirken [69], ähnlich wie P2Y-R. Außerdem bewirkt Bradykinin-Stimulation die Aktivierung der Proteinkinase-C (PKC), diverser Proteintyrosinkinasen, mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) und Phospholipase-2 [126], aber auch des Arachidonsäure-Umsatz. Außerdem kann die FAK-Phosphorylierung B-Rezeptor-induziert über Src-Aktivierung direkt [236] oder indirekt Kalzium-abhängig über die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase (CamK2) eingeleitet werden [203]. Im Remodeling und bei pathologischen Resorptionsvorgängen wirkt Bradykinin proresorptiv und synergistisch mit Osteoklastogenese-induzierenden, inflammatorischen Zytokinen in ihrer Potenzierung der Prostaglandinsynthese [24].

Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Zellmotilität und damit auch Zelladhäsion haben zentrale Relevanz in Bereichen wie Tumorforschung, Embryologie, Immunologie sowie Wund- und Knochenheilung. Durch die intensive Forschung an den beteiligten zellulären Mechanismen konnte in den letzten 30 Jahren das Struktur- und Funktionsverständnis der Adhärenz-Maschinerie verbessert werden. Dennoch bleibt ihre Komplexität und Wechselwirkung mit verschiedenen Umgebungsreizen im Detail unverstanden. Um einen Beitrag zum besseren Verständnis solcher Wechselwirkungen und Adaptationsvorgängen zu leisten, sollen in dieser Arbeit Adhärenz-Kräfte beobachtet und die Umverteilung des Strukturproteins Paxillin unter Stimulationsbedingungen untersucht werden. Dabei stehen Kalziumkonzentrationsveränderungen und die Entwicklung Paxillin-haltiger subzellulärer Aggregate nach Stimulation mit externen Liganden im Mittelpunkt. Primäre bovine Osteoblasten wurden transfiziert, um das in FA vorkommende Protein Paxillin durch Kopplung an das grün-fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, eGFP) in den Zellen unter Stimulationsbedingungen darzustellen. So sollen die Dynamik Paxillin-haltiger Aggregate selbst, die stimulationsgefolgte Paxillinintegration und dessen Lokalisation beobachtet werden. Zur Zellstimulation kommen ATP und Bradykinin unter anderem wegen ihrer Bedeutung im Entzündungsprozess [21] und der parakrinen Regulation [217] zum Einsatz.

Folgenden Fragen wurden sich in dieser Arbeit experimentell zugewandt:

- Wie stellt sich das Kräfteprofil von adhärennten pOB dar und wie verändert es sich bei deren Ablösung durch Trypsin?
- In welcher Beziehung steht die räumliche Verteilung der intrazellulären Kräfte zu Paxillin-markierten Adhärenzstrukturen?
- Wie stellt sich die Dynamik von Paxillin in stabilen FA von pOB dar?

- Gibt es eine subzelluläre Umverteilung von Paxillin in ATP- und Bradykinin-stimulierten pOB?
- In welchem zeitlichen Verhältnis stehen Liganden-induzierte Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Reorganisation des Zytoskeletts?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Name	Nummer	Hersteller
A23187, 4-Bromo (Ionophor)	100107	Calbio-chem, Merck
Acrylamid-Bisacrylamid	7867.1	Carl Roth
3-Aminopropyltrimethoxysilan	213-048-4	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	2317865	FLUKA
Amphotericin-B-Trockensubstanz	00040577	Squibb
L-Ascorbinsäure-Phosphat	01312061	WAKO
Kalziumchlorid-Dihydrat	233-140-8	Merck
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	28718-903	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	2006643	Carl Roth
Dulbecco's gebufferte Salzlösung	H15-002	PAA
Earle's Salzlösung	L 1915	Biochrom AG
EGTA (Ethylenglycol-Tetraessigsäure)	E-3889	Sigma
Ethanol 96 %	1170	Otto Fischer GmbH
FURA-2AM	C44H47N3O24	Sigma
L-Glutamin	M11-004	PAA
Glutaraldehyd	23115	Serva
Hank's-Lösung	L2035	Biochrom AG
Hank's-Lösung ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	L2045	Biochrom AG
HEPES	9105.2	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	9809110005	Mallinckrodt Baker

Nanofectin	Q0005-001	PAA
Nanofectin Diluent	S05-02	PAA
NaOH	CE 215-185-5	Merck
Paxillin Rabbit monoklonaler Ab	1500-S	Epitomics
Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAA
2-Propanol	59300	Fluka-Sigma
RAIN-X	29-112018	Shell Car Care
Rhodamine-Red-X anti-Rabbit Antikörper	10.03.03	Dianeva
Sulfo-SANPAH	22589	PIERCE
TEMED	2367.3	Carl Roth
Trypsin-EDTA	L11-003	PAA
Triton-X-100 (2%)/ PBS	93427-1 EA	Fluka-Sigma

2.1.2 Zellen

- Primäre bovine Osteoblasten der Ulna eines zweijährigen Bullen der Schlachtereier „Vieh und Fleischhandel“, 35083 Wetter
- E. coli HB101 – von Amersham

2.1.3 Kulturmedien

Earle's Lösung

- 50 ml Earle's (10 x) Lösung
- 450 ml *aqua dest.*
- 225 mg NaHCO₃
- Titration auf pH 7,3
- ggf. 25 ml Penicillin/Streptomycin (50000 IEI)
- ggf. 2 ml Amphotericin

BGJb-Medium-Zusätze für pOB:

- BGJb-N-Medium

- 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (100 x; 25000 UI)
- 5 ml Glutamin (100x)
- 1 ml Vitamin C der Stammlösung (50 mg/10 ml aqua dest.)
- 50 ml FCS (~10%)

Ham's-F10-Medium:

- 2,38 HEPES (1M) als Puffersubstanz
- 0,24 g/l NaHCO₃
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x; 25000UI)
- 2 ml Vitamin C der Stammlösung
- 9,89 g Ham's-F10 Instamed
- Titration auf pH 7,3
- Sterile Filtration

HEPES-Lösung 50 mM:

- 11,9 g HEPES-Plätzchen in 1 l *aqua dest.* lösen
- bis pH 8,5 mit NaOH auftitrieren

Name	Nummer	Hersteller
BGJb-Medium	B1091	United States Biological
Bovines Serumalbumin	11930	Serva electrophoresis
Fetales Kälberserum, 10 %	615B	Seromed
Ham's-F10-Medium	FG 0715	Biochrom AG
Instamed Ham's-F10	T071-01	Biochrom AG
RPMI1640-Medium	FG1215	Biochrom AG
SIN-Medium	1.07882.0500	Merck

2.1.4 Aktivatoren

Name	Nummer	Hersteller
ATP, Natriumsalz	K045.1	Carl Roth
Bradykinin	2277812	Fluka, SIGMA

2.1.5 Sondermaterialien

Name	Nummer	Hersteller
Monoklonaler Anti-Paxillin-Antikörper	-	Epitomics, USA
Sekundäranitkörper Texas-Red	-	Molecular Probes
Faltenfilter, 11 cm ø	-	Whatman
Carboxylat-modifizierte Mikrosphären 0,5 µm, red fluorescent (580/605), FluoSpheres	F-8812	Molecular Probes, USA
Carboxylat-modifizierte Mikrosphären 0,2 µm, red fluorescent (580/605), FluoSpheres	F-8810	Molecular Probes, USA
Plasmid Midi Kit	12143	QIAGEN
Silikon-Kleber für Aquarien	A-1072	Dow-Corning
Silikonringe	-	Qualitätsgrad 55Shora A

2.1.6 Plasmide

Das hier verwendete Plasmid wurde großzügiger Weise bereits in klonierter Form von Dr. Lavelin vom Department of Molecular Cell Biology des Weizmann Institute of Science zur Verfügung gestellt. Durch Klonierung wurde die Geninformation für das komplette humane Protein Paxillin in den pEGFP-C1-Plasmidvektor (4,7 kB; von Clontech Laboratories) inseriert, sodass Paxillin gekoppelt an eGFP-C1 in den Zielzellen exprimiert und somit visualisiert werden konnte. Die relevante Vektorinformation steht dabei unter transkriptionaler Kontrolle des humanen Zytomegalie-Virus Immediate-Early-Promotors.

Im Kontrollexperiment wurde ein pEGFP-N1 Vektor (4,7 kB) benutzt, der für den

eGFP-gekoppelten, kompletten humanen Transkriptionsfaktor STAT1 kodiert. Der klonierte Vektor wurde von Prof. Dr. mult. Thomas Meyer (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Apparaturen und Programme

Brutschrank: Heraeus Instruments bei 37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte Fluoreszenzmikroskop: Photonic Science, Nikon Diaphot IM Eclipse TE2000-U; 40x Objektiv; gekoppelt mit einer 8-Bit, gekühlten CCD-Kamera (Xillix micro Imager MI1400 mit 1306 x 1032 Pixeln; Extended ISIS, Photonic Science, Robertsbridge, UK) und einem Monochromator (Visitech, Sunderland, UK)

Gefrierschrank -80 °C: Sanyo VIP Series

Laborarbeitsbank (steril): Gelaire BSB4, SN 81145

Neubauerzählkammer: Superior Marienfeld

Stickstofftank: Apollo Messer Griesheim

Stickstoff-Zell-Tank: Tayler-Wharton

Vortex: Heidolph

Waage: Sartorius

Wärmegerät: Eppendorf Thermomixer

5436 Zentrifuge (groß): Beckmann J2-

21M/E Zentrifuge: Hettich Universal

Stromgeräte:

Driel 68806 basic power supply 50 -

200 Watt Power Manager Voltkraft

Richard Wolf Combilightpad 5133

Programme:

ImageProPlus 5.1.0.20 für Windows XP Professional

MetaFluor (Quanticell 700 Imaging System; Applied Imaging Visitech, UK)

Windows 2000, Vista, 8

Meta imaging series (Universal Imaging Corporation) Microsoft

Office 2007 für Windows Vista

SPSS Version 17, 18 Adobe Photoshop

LIBTRC im Linux-Betriebssystem von Prof. M Dembo, Boston

LAS AF Lite

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Gewinnung primärer boviner Osteoblasten

Zur Gewinnung primärer Osteoblasten wurde nach dem Auswachsverfahren von Jones und Bingmann [112] gearbeitet, das im eigenen Institut gut etabliert ist. Ein lokales Schlachthaus stellte die Ulna eines zweijährigen Jungbullens zur Verfügung, die als Quelle für primäre Osteoblasten diente. Das Vollpräparat wurde mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert, das Weichteilgewebe entfernt und der Knochen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 0,5 cm breite und 10 cm lange Streifen in das Periost geritzt und mit einer Pinzette abgezogen. Die Perioststreifen wurden dreimal für 10 Minuten in Earle´s-Lösung bei 37 °C in 5 %-iger CO₂ Atmosphäre gewaschen. Es folgte eine weitere Waschung für 20 min mit Earle´s-Lösung plus Antibiotika und Antimykotikum bei 37 °C. Die Perioststreifen wurden in 5 mm kleine Stücke zerteilt, wovon je 8 - 10 in Kulturschalen (ø 14 cm) mit 20 ml BGJb-Medium mit 10 % FCS, 1 ml Vitamin C und 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (25000 U/l) suspendiert wurden. Diese Ansätze wurden bei 37 °C und 5 %-iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden und anschließend einmal wöchentlich bis zum Erreichen einer konfluenten Kultur (nach 4 - 5 Wochen). Die geernteten Zellen wurden entweder für direkt anstehende Versuche in Zellkulturflaschen ausgesät oder kryokonserviert. Zur Ablösung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die adhärente Zellschicht zweimal mit PBS gewaschen und 3 Minuten mit 6 ml Trypsin inkubiert; der Ablösevorgang wurde durch Medium-Überschuss (18 ml) gestoppt. Die Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen aufgenommen und bei 1000 Upm 15 Minuten zentrifugiert. Der Medium-Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit Ham's-F10-Medium resuspendiert und die Zellen in kleine Gewebekulturflaschen ausgesät.

Es ist bekannt, dass in Kulturen von primären Osteoblasten eine hohe Heterogenität vorliegt: Präosteoblasten, Osteoblasten unterschiedlicher Reife und

auch Fibroblasten können in der Kultur gefunden werden [100]. Die oben beschriebene Auswachsmethode mit pOB ist ein Standardverfahren im hiesigen Institut, an das sich die biochemische Charakterisierung der Phänotypen der vorliegenden Zellen durch immunzytochemischen Nachweis der Osteoblasten-Marker Osteokalzin und Osteopontin, alkalischer Phosphatase und der Expression von Prokollagen I anschließt. Aufgrund der standardisierten Methode wird in dieser Arbeit auf eine Charakterisierung verzichtet, das Vorliegen von primären Osteoblasten in ihrer Heterogenität angenommen und auf eine institutseigene Dissertation verwiesen [183].

Langzeitlagerung der Zellen

Kryokonservierung ermöglichte eine Langzeitlagerung der Zellen durch Einfrieren bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dafür wurden die Zellen dreimal mit 12 ml PBS gewaschen, mit Trypsin-haltigem Medium abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert (s. oben). Die Zelldichte der Suspension wurde mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und dann so fraktioniert, dass pro Kryo-Röhrchen (1 ml) 6 Millionen Zellen eingefroren werden konnten. Im Verhältnis 1:1 wurden dann noch Dimethylsulfoxid (DMSO, 20 %) zugegeben. Die beschrifteten Kryo-Röhrchen wurden 1 Stunde auf Eis gelegt und dann in einem Propanol-gefüllten Styroporbehälter zunächst bei -80 °C tiefgefroren, sodass eine sukzessive Temperaturminderung erfolgte. Nach 2 Tagen wurden die Kryo-Röhrchen in Flüssigstickstoff eingelagert. Bei Bedarf wurden sie aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Röhrchen-Inhalt wurde dann umgefüllt und in je 10 ml Ham's-F10-Medium gelöst; die Suspension wurde dann bei 1000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 4 ml neuem Ham's-F10-Medium resuspendiert. Je 4 ml frisches Medium wurden in kleine Gewebekulturflasche gefüllt und das Zellgemisch hinzu pipettiert bis eine Basisdichte von ca. 3500/cm² erreicht war. Diese Kulturflaschen wurden im Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte) zum Auswachsen inkubiert und die Zellen frühestens 24 h später für Versuchsansätze verwendet; alternativ erfolgte alle 48 h ein Mediumwechsel.

Passagieren der Zellen

Das alte Medium der Kulturflasche wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt, der verbleibende Zellmonolayer zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, danach abtrypsinisiert und die Zellen in einer neuen, beschrifteten Kulturflasche mit 4 ml frischem Medium resuspendiert, um bei 37 °C wieder im Brutschrank kultiviert zu werden. So konnten die Zellen auf mehrere Kulturflaschen bei besseren Proliferationsmöglichkeiten in einer reduzierten Zellzahl (ca. 1:5) aufgeteilt werden. Es wurden maximal 2 - 3 Passagen vorgenommen, um ein Ausdifferenzieren der primären Zellen zu vermeiden. Für Versuche wurde eine Zelldichte von 3000 - 5000/cm² angestrebt.

Herstellung von eGFP-Paxillin-exprimierenden Osteoblasten

Die Silikongerüste mit vier Kammervorrichtungen und 24 x 60 mm großen Deckgläsern wurden zuerst sterilisiert. Letztere wurden dann durch Kapillarkräfte am Silikon-Gehäuse fixiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 15000/cm² in die Vertiefungen des Zellkulturkammersystems ausgesät. Die Kammern wurden dann im Brutschrank 48 h bei 37 °C bebrütet. Darauf folgte die Transfektion von pOB mit dem eGFP-Paxillin-kodierenden Plasmid (bzw. dem Kontroll-Plasmid), das nach Transformation aus E. coli isoliert worden war. Versuche konnten nach 48 h bei adäquater Transfektionsrate durchgeführt werden, wobei Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien auszuschließen waren. Vor Versuchen wurden die Zellen für 30 Minuten mit frischem Ham's-F10-Medium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Ziel war es, Paxillin in pOB durch Fluoreszenzanregung darzustellen, wofür die entsprechend modifizierte DNA in Form eines Plasmids in die Zellen eingeschleust werden musste. Ein Plasmid ist ein ringförmiges, autonom replizierendes DNA-Molekül, das mehrere Proteine kodieren kann. Zur Replikation besitzt ein Plasmid eine Replikationsstelle, die mit dem Bakterienstamm kompatibel sein muss, damit das Plasmid unabhängig vom Bakteriengenom amplifiziert werden kann.

Hier eingesetzte Plasmid-Vektoren enthielten u.a. die genetische Information für das an eGFP-gekoppelte Protein Paxillin bzw. das an eGFP gekoppelte Kontrollprotein STAT1. EGFP ist ein modifiziertes Protein aus der Quallenart *Aequorea victoria* mit Absorptionsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 508 nm [208]. Die Plasmidvektoren pEGFP-C1 für das Paxillin-cDNA-Insert und pEGFP-N1 für das STAT1-Gen stammten von Clontech. Vor der Transfektion wurde das Plasmid in Bakterien transformiert, die das Plasmid amplifizierten: Freie DNA (Plasmid) wird ohne Hilfe von viralen Vektoren von kompetenten Bakterienzellen aufgenommen. Diese Kompetenz musste in den *E. coli* erst hergestellt werden, indem diese mit Kalziumchlorid behandelt wurden. So wurde einer elektrischen Abstoßungsreaktion zwischen der negativ geladenen DNA und der Zellmembran-Außenseite vorgebeugt und Poren für den Plasmid-Durchtritt in der Zellmembran geschaffen. Als Selektionskriterium diente Resistenz gegen Ampicillin.

Zur Transformation wurde 1 ml der Bakterienstammlösung *E. coli* HB101 in 30 ml SIN-Medium gelöst, bei 37 °C 3 Stunden lang mit 180 Upm geschüttelt und dann eine Stunde bei 37 °C in Ruhe gelassen. Dann wurde die Suspension umgefüllt und mit 3500 Upm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 0,1 M Kalziumchlorid resuspendiert und dann 30 Minuten in Eiswasser gelagert. Dann wurden 100 ng Plasmid mit 100 µl der kompetenten Bakterienzellen gemischt und für 30 Minuten in Eiswasser gekühlt. Die Falcon-Röhrchen mit der Suspension wurden für 90 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad erhitzt und dann für 5 min in Eiswasser gelegt. Durch diesen Temperaturschock konnte das Plasmid effektiver durch die Poren in Zellen gelangen. Es wurden 400 µl SIN-Medium hinzugefügt und das Gemisch eine Stunde mit 105 Upm bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden 50 ml SIN-Medium mit 2,5 mg Ampicillin beigelegt und mindestens 5 Stunden bei 180 Upm und 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag konnte das amplifizierte Plasmid mit dem etablierten Qiagen-Kit isoliert werden [18].

Durch Transfektion soll Fremd-DNA (Plasmid) in eukaryotische Zellen (pOB)

eingeschleust werden. Eine Transfektion kann transient oder stabil sein; transient bedeutet, dass das Plasmid außerhalb des Zellgenoms bleibt und nach einer gewissen Zeit abgebaut wird, sodass auch das Protein nur temporär exprimiert wird. Bei stabiler Transfektion wird die DNA dauerhaft in das Zellgenom integriert, was eine dauerhafte Proteinexpression bewirkt. Hier kam die transiente Transfektion zum Einsatz: In ein Eppendorf-Behälter wurden 1,5 µg Plasmid, 100 µl Nanofectin-Diluent und 5 µl Nanofectin pipettiert und mittels Vortex gemischt. Die vorbereiteten Silikonkammern mit pOB wurden zweimal mit PBS gespült und dann 150 µl Ham's-F10-Medium in jede Kammer gegeben. 20 Minuten nach Ansetzen der Plasmid-Mischung wurde jede Kammer mit 25 µl davon versetzt und bei 37 °C 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Traction Force - Zugkraftanalyse

EGFP-Paxillin-exprimierende pOB wurden auf ein Kollagen-beschichtetes, flexibles Polyacrylamidgel aufgebracht (3000 Zellen/cm²), das fluoreszierende Kügelchen (Beads) enthielt. Zell-generierte Kräfte verformten dieses Gel und bewirkten somit eine Positionsveränderung der Beads darin, wobei Kollagen für den Halt der Zellen auf der Unterlage sorgte. Die fluoreszenzmikroskopisch beobachtete Dislokation der Beads im Versuchsverlauf wurde elektronisch gespeichert und über ein Analyseprogramm in Kraftvektoren umgerechnet, die dann einer der Zelle virtuell überlagerten Matrix örtlich zugeordnet wurden. Dafür wurden die Fluoreszenzmuster der Beads im Versuchsverlauf mit einem Referenzbild verglichen. Bei dem Programm handelte es sich um LIBTRC im Linux-Betriebssystem. Als Unterlage der Gele wurden 24 x 60 mm große Objektträger sterilisiert und Silikonringe (ø 1,5 cm) mit Aquariumssilikon (biokompatibel) aufklebt, sodass dichte Kammern entstanden. Diese trockneten bei Raumtemperatur für 24 h, wurden dann für 24 h in destilliertes Wasser gelegt und erneut getrocknet. Die Glasfläche in den Kammern wurde daraufhin mit 0,1 M NaOH bestrichen; nach der Trocknung wurde gleichmäßig je ein Tropfen Aminopropyltrimethoxysilan aufgetragen. Nach 5 Minuten wurden die Kammern dreimal mit destilliertem Wasser gespült und 5 Minuten unter Schütteln gewaschen. Dann wurde für 30

Minuten 0,5 %-iges Glutaraldehyd/PBS in die Kammern gegeben. In der Zwischenzeit wurden runde Deckgläschen (\varnothing 16 mm) zweimal mit dem wasserabweisenden Reagenz Rain-X gespült. Es wurden Gele mit 8 % Acrylamid und 0,06 % Bis-Acrylamid und das im Institut für pOB etablierte Gel-Elastizitätsmodul 7000 N/m² verwendet [45]. In 2 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung wurden folgende Mikrosphären-Beads in 1:3 Verhältnis eingebracht: 10 μ l der 0,5 μ m \varnothing Beads und 30 μ l der 0,2 μ m \varnothing Beads. Zur Luftblasenentfernung wurde das Gemisch in ein Vakuumröhrchen gefüllt, ein an die Saugung angeschlossener Gummischlauch aufgesetzt und abgedichtet, sodass dann für 10 Minuten Unterdruck erzeugt werden konnte. Um den Polymerisationsvorgang zu starten, wurden 10 μ l gekühltes Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10 %) und 1 μ l gekühltes TEMED zur Katalyse der APS-Radikalbildung zugegeben. Dann wurden sofort je 14 μ l dieses Gemischs auf die vorbereiteten Objektträger getropft und jede betropfte Kammer schnell mit einem runden Deckgläschen bedeckt. Das Gelvolumen von 14 mm³ konnte sich gleichmäßig unter den Deckgläschen ausbreiten und bei 16 mm Kammerdurchmesser eine einheitliche Höhe von 70 μ m erreichen [45]. Die Objektträger wurden um 180° gedreht, sodass die Fluoreszenzpartikel an die Geloberfläche sanken, und dann getrocknet. Nach vollständiger Polymerisation (4 °C, 12 h) konnten die Deckgläser, ohne die Gele zu beschädigen, wieder entfernt werden und diese wurden dann zweimal 15 Minuten mit HEPES-Lösung gespült.

Da Zellen kaum auf der glatten Oberfläche des Polyacrylamidgels haften können, wurde eine einzelne Schicht Kollagen Typ I aufgebracht: Nach Abgießen der HEPES-Lösung wurden je 200 μ l Sulfo-SANPAH auf die Gele gegeben, das zur Bindung an Polyacrylamid Photoaktivierung benötigt. Für 10 min wurden die Gele einer 10 cm entfernten UV-Lampe ausgesetzt und danach mit HEPES 3 Minuten gespült. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Dann wurden die Gele mit 0,2 mg/ml Kollagen bedeckt und für 24 h bei 4 °C gelagert. Überschüssiges Sulfo-SANPAH und Kollagen wurden dreimal mit PBS abgespült. Erneut wurden die Gele zweimal für 10 Minuten UV-Beleuchtung ausgesetzt.

Danach konnten sie, in Lagerbehälter gebettet und mit PBS bedeckt, im Kühlschrank drei Wochen aufbewahrt werden. EGFP-Paxillin-exprimierende pOB wurden in einer Zelldichte von $3000/\text{cm}^2$ auf die Gele aufgebracht. Zur Zugkraftanalyse wurde eine alleinstehende Zelle ausgewählt. Das zelltragende Gel wurde nach dem Transport 20 Minuten immobilisiert und dann auf dem Metallträger des Fluoreszenzmikroskops befestigt. Zuerst wurden für 1 Minute alle 10 Sekunden Bilder der an der Oberfläche des Gels ansässigen Fluoreszenzmarker registriert, um für den späteren Vergleich bei Zellzugbelastung ein Referenzprofil zu erlangen. Dann wurde eine Trypsin-Induktion vorgenommen und währenddessen Bilder registriert. Die dabei auftretende Positionsveränderung der Beads wurde vom Analyseprogramm extrahiert und in einem Optischen-Fluss-Algorithmus dargestellt. Nach Umriss- und Zellkernmarkierung im Fluoreszenzbild wurde eine Matrix über der Zellfläche erstellt, deren Knotenpunkte den invers-errechneten Kraftvektoren zugeordnet wurden. Folgende Situationen wurden für diese Berechnungen bildlich aufgenommen und im Programm gespeichert:

- Zell-defokussierte Ebene zur Beads-Darstellung als Referenzbild
- Bestimmung der initialen Position der Beads bei adhärenen Zellen
- Positionsveränderung der Beads während der Ablösung der Zellen
- Computerbasierte Umrandung von Zytoplasma/Nukleus im Fluoreszenzbild

2.2.3 Immunzytochemischer Paxillin-Nachweis

Zum qualitativen Nachweis von exprimiertem Paxillin der transfizierten pOB wurde eine immunzytochemische Färbung vorgenommen. Auf sterile Deckgläser (\varnothing 14 mm) wurden transfizierte Zellen ($30000/\text{cm}^2$) ausgesät und in Ham's-F10-Medium 3 Tage bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums und zweifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer 1:1 Methanol/Aceton-Lösung für 10 Minuten bei 20°C fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dreimal mit 0,2 %-iger Triton-X-100/PBS-Lösung gespült, um die

Oberflächenspannung der Suspension herabzusetzen und die Zellmembranen zu permeabilisieren. Dann wurden 40 µl Primär-Antikörper hinzugefügt und die Zellen 24 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneuten Triton-X-Waschungen wurde der Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelte Sekundär-Antikörper hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine zusätzliche Hoechst-Färbung (DAPI) zur Kerndarstellung vorgenommen, wobei DAPI zusammen mit dem Sekundär-Antikörper beigefügt wurde. Die Färbung wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt, die Deckgläser luftgetrocknet und mit ø 12 mm Deckgläschen eingedeckelt. Bei zusätzlichen Versuchen wurden die pOB vor der Fixierung und anschließenden Färbung mit 100 µM ATP (Endkonzentration) aktiviert.

2.2.4 Stimulation von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB mit ATP oder Bradykinin

Der Aktivierungsversuch fand 48 h nach der Transfektion statt. Die Zellen wurden auf Kontamination und Zelldichte hin untersucht und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit 200 µl HEPES bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Der jeweilige tiefgefrorene Aktivator wurde aufgetaut und durchmischt. Zur Vorbereitung wurden Eppendorf-Behälter mit je 100 µl Ham's-F10-Medium gefüllt und auf 38 °C erwärmt. Die Silikonkammern wurden auf dem Metallträger des Mikroskops fixiert. Bei Blaulichtanregung wurde eine freiliegende, adhärente Zelle mittlerer Größe gesucht, die das rekombinante Fusionsprotein eGFP-Paxillin-exprimierte. Die Zelle wurde dann im ImageProPlus Programm des Mikroskopie-gekoppelten Computers in einer Preview-Einstellung dargestellt. Als Standardeinstellung wurde eine Aufnahmefrequenz von 1 Bild pro 10 Sekunden bei maximal 300 Bildern gewählt. In die angewärmten Inkubationskammern mit je 100 µl Ham's-Lösung wurden entweder 3 µl Bradykinin oder 3 µl ATP pipettiert. Für alle Aktivierungsversuche wirkten letztlich Endkonzentrationen von 100 µM ATP oder 1 µM Bradykinin auf die Zellen. Während der Aufnahme des 5. Bildes der ausgewählten Zelle wurde die Aktivator-Lösung in

die betreffende Kammer pipettiert ohne diese oder den Flüssigkeitsspiegel zu berühren. Es wurden 60 - 200 Fluoreszenzbilder, sowie Phasenkontrastaufnahmen vor und nach der Aktivierung aufgenommen. Die Aktivierungsversuche wurden analog bei STAT1-eGFP-exprimierenden Zellen durchgeführt. Zur Analyse wurde das Auftreten Paxillin-markierter Aggregate betrachtet, deren Entstehungsverlauf und Anzahl als Mittelwerte mit Standardabweichungen in Punktediagrammen (Microsoft Office 2013 Excel) dargestellt wurden.

2.2.5 Fluoreszenzmessungen an ATP-induzierten Paxillin-Clustern

Die beobachteten Paxillin-haltigen Strukturen (mind. 5 Pixel) wurden als Zielregionen (Region of Interest, ROI) definiert und für jede definierte Zielregion die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität registriert. Zur Auswertung wurden die einzelnen Intensitäts-Zeitkurven bei entsprechender Zeitanpassung relativ zum geometrischen Kurvenschwerpunkt ausgerichtet. Es wurde eine Normalisierung des Intensitätssignals jeder Zielregion auf den Intensitätswert von 1 vorgenommen und über alle registrierten Kurven gemittelt. Durch die Analyse des Abstands zwischen den Zeitpunkten, an denen die Intensität halbmaximal war (Messung der Halben-Distanz nach der Halbwertsmethode [190]), jeweils getrennt für die Assemblierungsphase und die Disassemblierungsphase, konnte die mittlere Lebensdauer der Zielregion bestimmt werden.

2.2.6 Totale-Interne-Reflexionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRF)

Im Institut für Zytobiologie der Universität Marburg wurden mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Dr. Jakob TIRF-Messungen ($n = 6$) von ATP-stimulierten, eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB durchgeführt [5]. Dazu wurden auf Objektträger kultivierte pOB auf den warmen Inkubator-Tisch (27 °C) des Mikroskops platziert (motorisiertes Leica DMI 6000B Mikroskop mit TIRF-Illuminationsmodul und 12-bit CCD-Kamera). TIRF-Bilder wurden alle 30 Sekunden nach ATP-Stimulation über 12 Minuten mit Hilfe eines 100 x 1.45 Plan-Neofluar-Ölimmersionsobjektivs bei einer 488 nm Exzitation und evaneszentem Feld von maximal

110 nm Tiefe aufgenommen [207]. Die Epifluoreszenz wurde auf Grün, das TIRF-Signal auf Rot programmiert. Mit einem 535 nm-Laser wurden die TIRF-Signale durch einen Adapter aufgezeichnet und computergestützt gespeichert.

2.2.7 Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP)

Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) wurde an adhärenenten, eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB durchgeführt (n = 4). Bei FRAP findet eine Bleichung von Fluoreszenzmolekülen (hier: eGFP-Paxillin) in ausgewählten Zellregionen (hier: Paxillin-haltige Aggregate) durch einen Laserimpuls statt, sodass diese Moleküle in einen irreversibel nichtfluoreszierenden Zustand übergehen. Gemessen wird die Wiederauffüllungs-Rate, also der Anteil der anschließend wiedererlangten Fluoreszenzintensität durch neueinströmende Moleküle, und die Recovery-Dauer, sodass FRAP die Proteinkinetik in den Zellen darstellt. Die Rohdaten wurden mit Unterstützung von Bastian Pfau (Institut für Optik und atomare Physik, TU Berlin) graphisch aufgearbeitet. Ein Argon-Laserstrahl ($\lambda = 488$ nm) wurde durch ein konfokales Fluoreszenz-mikroskop (Leica TCS SP2A OBS, Mannheim) mit einem 100 x/1.3 Objektiv in einen Gauß-Strahl fokussiert, der als Bleich-Strahl diente. Die Zielregion (ROI) war jeweils eine Zellregion mit ein bis zwei Paxillin-haltigen Aggregaten; diese wurden für 15 Sekunden gebleicht und die folgende Fluoreszenzveränderung für 200 Sekunden mit abgeschwächtem Laserstrahl gemessen. Die Vitalität der Zellen nach dem Laserimpuls, der allgemein nicht als phototoxisch bewertet wird [204], wurde hinsichtlich unveränderter Zellmorphologie und Abwesenheit von Zelltodanzeichen oder Apoptose untersucht. Intensitätsunterschiede zwischen ungebleichten und benachbarten gebleichten ROI wurden berechnet und gegen die Zeit als Recovery von eGFP-Paxillin in pOB aufgetragen. Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde die an die Fluoreszenzsignale vor der Bleichung normierte Recovery-Kurve an ein doppelt-exponentielles Modell der Gleichung

$$F(t) = R - A \exp(-t \ln 2 / t_{1/2}^{\text{fast}}) - B \exp(-t \ln 2 / t_{1/2}^{\text{slow}})$$

angepasst, wo $F(t)$ für Fluoreszenzintensität am Zeitpunkt t steht, R die wiedergewonnene, $t \rightarrow \infty$ die extrapolierte und $R-A-B$ die initiale Fluoreszenz bei $t = 0$ nach der Bleichung ist.

2.2.8 Kalziummessungen

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mit dem fluorochromen Kalziumindikator Fura-2AM (Acetoxymethylester) dargestellt. Fura-2AM bindet als Chelator Kalziumionen mit vier Carboxylgruppen. Komplextiertes Fura-2AM hat ein Absorptionsmaximum der Wellenlänge 340 nm, das im kalziumungebundenen Zustand bei 380 nm liegt [199]. Steigt der Kalziumgehalt, kommt es bei 340 nm Anregung zum Anstieg und bei 380 nm zur Abnahme der jeweiligen Fluoreszenzintensität. Eine Fura-2AM gefärbte Zelle fluoresziert bei 340 nm Anregung mit der Intensität F_{340} bei 505 nm, die von Farbstoffkonzentration, Zelldicke, intrazellulärer Kalziumkonzentration und der Messkonstante abhängt. Da ein F_{340} -Anstieg mit einem F_{380} -Abfall einher geht und deren Quotient eine Rechnung ohne die fehlenden Abhängigkeitsvariablen erlaubt, stellt deren Verhältnis (F_{340}/F_{380}) ein Surrogat für die intrazelluläre Kalziumkonzentration dar. Über dieses Verhältnis, hier Ratio genannt, und entsprechende Kalibrierung ist die Konzentration intrazellulären Kalziums über die folgende Formel berechenbar [94]:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

K_d = Dissoziationskonstante, 224 nM [94]

$\beta = (F_{380min}/F_{380max})$; maximale und minimale Intensitäten bei 380nm Anregung

R_{min} = Ratio F_{340}/F_{380} bei minimaler Kalziumkonzentration

R_{max} = Ratio F_{340}/F_{380} bei maximaler Kalziumkonzentration.

Zur Kalibrierung wurde die Fura-2AM-Fluoreszenz bei minimaler Kalziumkonzentration detektiert. Dafür wurden 264 μ l Hank's- Lösung ohne Ca^{2+} mit 6 μ l des

Ionophor A23187 (1,66 mM) versetzt. Das Ionophor induzierte Porenbildung in der Zellmembran zur Diffusion des intrazellulären Kalziums aus der Zelle entlang des Konzentrationsgefälles, um intrazellulär eine minimale Kalziumkonzentration zu erreichen. Das maximale Kalziumsignal wurde detektiert, indem die intrazelluläre Kalziumkonzentration ebenfalls mit Hilfe des Ionophors einem hohen extrazellulären Kalziumgehalt angepasst wurde; dafür wurden die Zellen einer 10 mM Kalziumlösung ausgesetzt. 3 μ l Kalziumchlorid (~ 1 M) wurden mit Hank's-Lösung auf 1:10 verdünnt und der kalziumarmen Hank's-Lösung zugefügt. Zur Herstellung der Kalziumchlorid-Lösung wurde 1,11 g Trockensubstanz in 10 ml destillierten Wasser gelöst und davon 3 μ l für die Zielkonzentration von 10 mM verwendet. Diese wurde 1:10 verdünnt, was im 300 μ l Endvolumen einem 10 mM Kalziumgehalt entspricht. Die Fluoreszenzsignale F_{340} und F_{380} wurden im Programm Metafluor des gekoppelten Computer mit Windows 2000 erfasst, die Ratio automatisch ermittelt und als dritte Kurve aufgezeichnet. Die gemessenen F_{340}/F_{380} -Ratios wurden gemittelt und die absolute Kalziumkonzentration wie oben angegeben berechnet. Es wurden bei 1 Hz F_{340} und F_{380} registriert und die Ratio mit einer 2-Hz-Frequenz ermittelt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde von den mittleren Fluoreszenzintensitäten für jede der beiden Anregungswellenlängen vor der F_{340}/F_{380} -Ratio-Ermittlung automatisch abgezogen.

Primäre Osteoblasten wurden in Silikonkammern ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. In sterile Behälter wurden je 600 μ l HEPES-Lösung, 6 μ l Fura-2AM und 3 μ l Pluronic pipettiert und vermischt. Davon wurden je 150 μ l in eine Kammer pipettiert und eine Stunde im Dunklen inkubiert, sodass die Zellen mit einer finalen Fura-2AM-Konzentration von 3 μ M gefärbt wurden. Nach einer anschließenden Waschung der Kammern wurden 200 μ l Ham's-F10-Medium in jede Kammer pipettiert. Die Zelldichte lag bei 3000/cm². Die Silikonkammer wurde auf der Metallplatte des Fluoreszenzmikroskops fixiert. Es wurde dann fluoreszenzmikroskopisch eine Zellgruppe ausgewählt, deren Zellen ($n = 8 - 15$) im Metafluor-Programm markiert wurden. Danach wurde die Signalaufnahme gestartet und die definierten Zielregionen sequenziell mit Wellenlängen 340 nm und 380 nm des Xenon-Lasers angeregt. Nach einer kurzen Akquirierungszeit

wurden die Zellen mit 3 μ l Bradykinin (Endkonzentration EK = 1 μ M) bzw. 3 μ l ATP (EK = 100 μ M) stimuliert, gelöst in 100 μ l HEPES-Lösung, welches in die jeweilige Kammer pipettiert wurde. Als Kontrolle diente 100 μ l HEPES-Lösung (n = 12). Die Ratio-Maximalwerte aller Zellen wurden gemittelt und im Excel-Programm graphisch dargestellt. Für die späteren Analysen wurde die Zeitspanne zwischen Aktivierung und Ratio-Höchstwert sowie der weitere Kurvenverlauf für 250 s nach Stimulation registriert.

Um die Frage zu beantworten, ob der Liganden-induzierten Kalziumanstieg aus intrazellulären oder extrazellulären Räumen stammte, wurden die Zellen mit Thapsigargin vorbehandelt. Thapsigargin, ein gängiger Inhibitor der Ca^{2+} -ATPasen des endoplasmatischen Retikulums (ER), entleert die intrazellulären Kalzium-Speicher [110]. Jeder anschließende Kalziumanstieg kann demnach nicht durch Kalziummobilisierung aus inneren Speichern, sondern nur durch einen externen Kalzium-Influx erklärt werden. Über zwei Tage kultivierte pOB wurden mit Fura-2AM (3 μ M) unter Zuhilfenahme von Pluronic zwei Stunden lang gefärbt, die Zellen danach zweimal mit HEPES gewaschen und dann während der Thapsigargin-Behandlung und nachfolgender Aktivierung mit ATP hinsichtlich der Kalziumveränderungen beobachtet. Für die anschließende Analyse wurden die Apparaturen und Bearbeitungs-Software des Instituts für Zellbiologie der Universität Marburg unter freundlicher Beaufsichtigung von Dr. Sophie Veitinger zur Verfügung gestellt (Leica Mikroskop s. TIRF-Versuch; Leica Microsystems Application Suite AF Lite Software). Die gefärbten pOB wurden für 30 min mit 3 μ M Thapsigargin inkubiert. Nach dieser Zeit war der Thapsigargin-induzierte Kalziumanstieg wieder auf Basalwerte abgefallen, was in nicht-gezeigten Test-Versuchen erprobt worden war. Danach wurde die Aktivierung mit gewohnten ATP-Konzentrationen durchgeführt und die intrazellulären Fura-2AM-Signale aufgezeichnet.

2.2.9 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse und Diagrammerstellung wurden Microsoft Office Excel 2007 bzw. 2013 und SPSS 18 verwendet. Wenn möglich wurden eine ANOVA mit Post-Hoc Tukey-Tests und eine Ausreißeranalyse durchgeführt. Als Signifikanzniveau im zweiseitigen t-Test wurde $p \leq 0,05$ akzeptiert.

Zur bildlichen Darstellung wurden die F_{340}/F_{380} -Ratios der 22 Versuchszellen der Thapsigargin-vorbehandelten Versuchsserie in ihrem Verlauf während der ATP-Stimulation bei Sekunde 30 gemittelt und zum besseren Vergleich an das Niveau der Vergleichsserie (ATP-Stimulierung ohne Thapsigargin-Vorbehandlung; $n = 33$) angeglichen. Diese lineare Transformation wurde anhand der Subtraktion der Differenz der Ausgangswerte der beiden Versuchsserien von den Mittelwerten der vorbehandelten Serie erzielt. Zur statistischen Sicherung wurden Rohdaten in SPSS verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Traction-Force-Messungen in eGFP-Paxillin-exprimierenden Osteoblasten

Ziel dieses Basisversuchs war die Messung der intrazellulären Kräfte eGFP-Paxillin-exprimierender pOB im adhärenen Zustand und bei Ablösung durch Trypsin ($n = 10$ Zellen). Dazu wurden eGFP-Paxillin-exprimierende pOB in ein Kollagen-beschichtetes Polyacrylamidsubstrat mit fluoreszierenden Beads eingebracht. Durch sequenzielle Fluoreszenzbildaufnahmen der Position der Beads vor und während der Trypsinexposition wurden die jeweiligen Zellzugkräfte über deren Substratdeformation computerbasiert berechnet. Die Einzelbilder wurden konvertiert und so strukturiert, dass die linuxbasierte LIBTRC-Software die Positionsveränderung der Beads relativ zu den nativen Beads-Positionen in Zellzugkräfte umrechnen konnte. Die vordefinierten Umrisse von Zelle und Zellkern lieferten die Basis für die Erstellung eines Flächengitters über die Zelle, auf dessen Grundlage dann pro Flächenelement der jeweilige Kraft-Vektor lokalisiert werden konnte. Abb. 2 zeigt einen typischen Ablösungsverlauf innerhalb 150 s nach der Zugabe von Trypsin. Die Zelle rundete sich besonders zu einer Seite hin (s. Pfeil) ab, war nach 130 s komplett abgelöst; und verschwand aus der Betrachtungsebene. Abb. 3 zeigt vergleichend die Zugkraftlokalisation (Vektor-Graphik, A) und das Paxillin-markierte Aggregat-Aufkommen (Fluoreszenzbild, B) der gleichen Zelle. Dabei fällt eine Übereinstimmung von Zellregionen mit starken Zugkräften und hoher Paxillin-Aggregat-Dichte auf (rot umkreist), was bei allen Versuchen qualitativ ähnlich war.

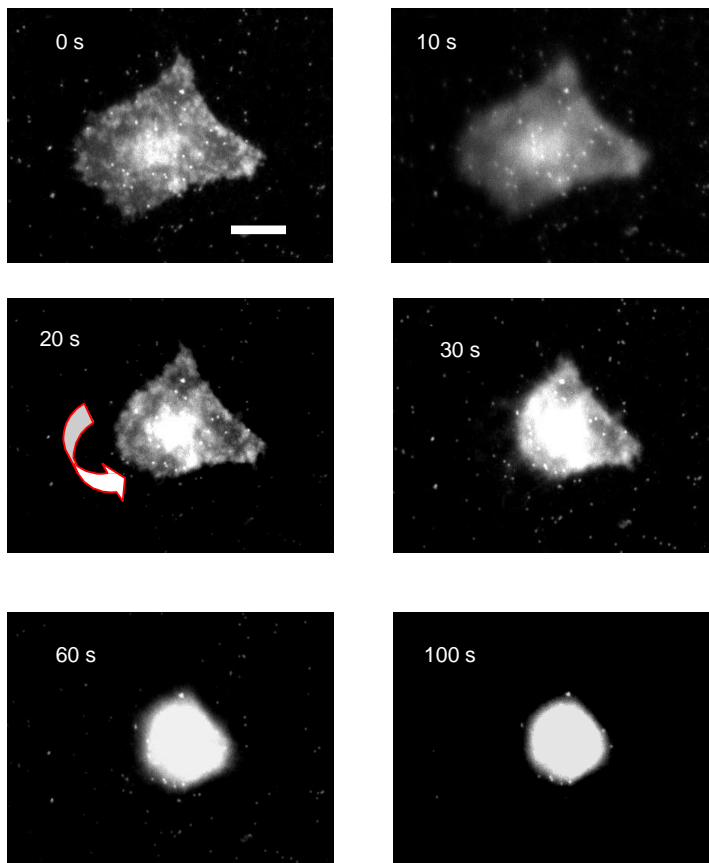
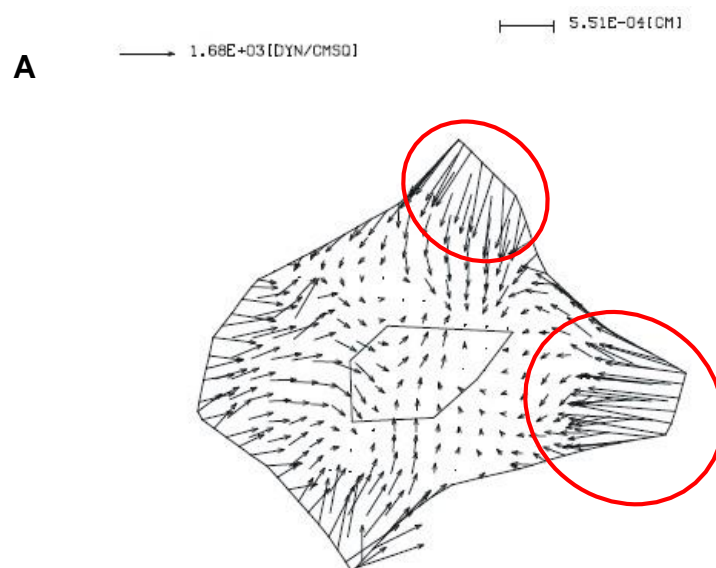


Abbildung 2: Ablösung eines kultivierten Osteoblasten durch Trypsin-Exposition

Fluoreszenzmikroskopie eines eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB während der Ablösung mit Trypsin innerhalb eines Zeitraumes von 100 s. Die Zellen, die in kollagenbeschichteten Polyacrylamid mit fluoreszierenden Beads eingebettet waren, kugelten sich bis zur kompletten Ablösung nach 130 s ab. Balken 10 μm .



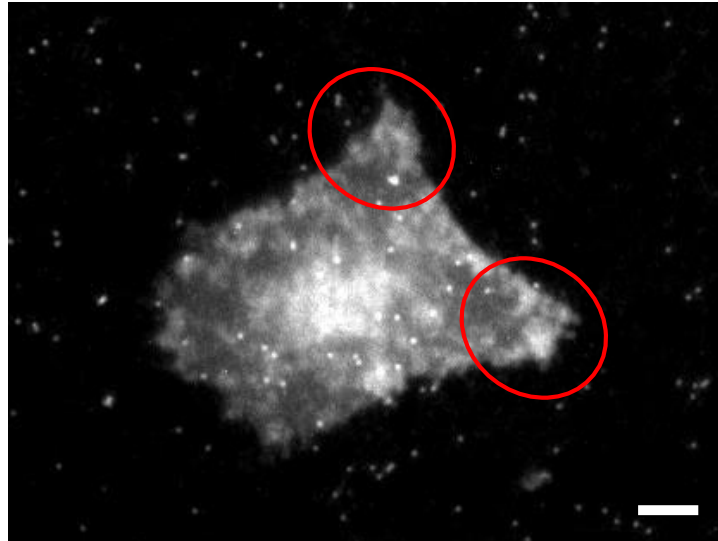
B

Abbildung 3: Vergleich von Kraftausmaß und FA-Aufkommen von adhärenen pOB

(A) Das LIBTRC-Programm transferierte die kraftinduzierte Beads-Dislokation im Substrat in zelluläre Kraftvektoren. Es fallen zentripetale, annähernd parallele Zugkraftbündel an den lateralen und kranialen Zellpolen auf (rot markiert in A). (B) Zugehöriges Fluoreszenzbild der gleichen Zelle. Regionen dichter FA-Ansammlungen in (B) stimmen mit Zugkraftbündeln in (A) überein. Balken 7 μm .

Abb. 4 zeigt die mittleren, flächengenormten Zugkräfte der pOB im adhärenen Zustand ($n = 10$ Zellen): Pro Zelle und Messzeitpunkt wurden 20 Kraftmessungen durchgeführt und deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Zellen weisen bezüglich ihrer Adhärenz-Kraft ein inhomogenes Bild auf. In 8/10 Fällen wurde eine Zugkraft von 300 – 1400 dyn/cm^2 gemessen, die restlichen 2 Zellen lagen über 2400 dyn/cm^2 . Bei der Ausreißer-Analyse der Daten wurde die 10. Zelle für die weitere Interpretation ausgeschlossen; ferner wurde die weitläufige Verteilung der Adhärenz-Daten in einem Whisker Plot verdeutlicht (Abb. 5)

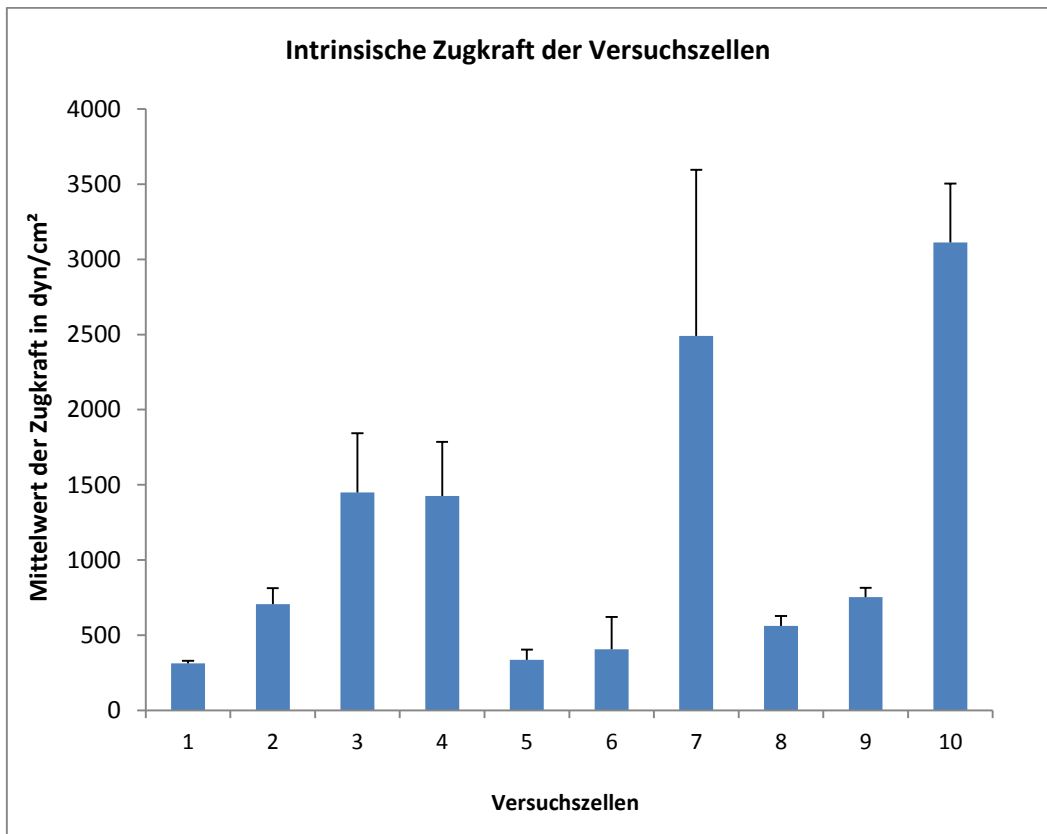


Abbildung 4: Adhärenzkräftevergleich aus den Traction-Force-Messungen

Gezeigt sind die mittleren Adhärenz-Kräfte (gemessen in dyn/cm²) aus 20 separaten Kraftmessungen pro Zelle mit Standardabweichungen. Die Zugkräfte stellen sich inhomogen dar mit Mittelwerten bei 702 dyn/cm².

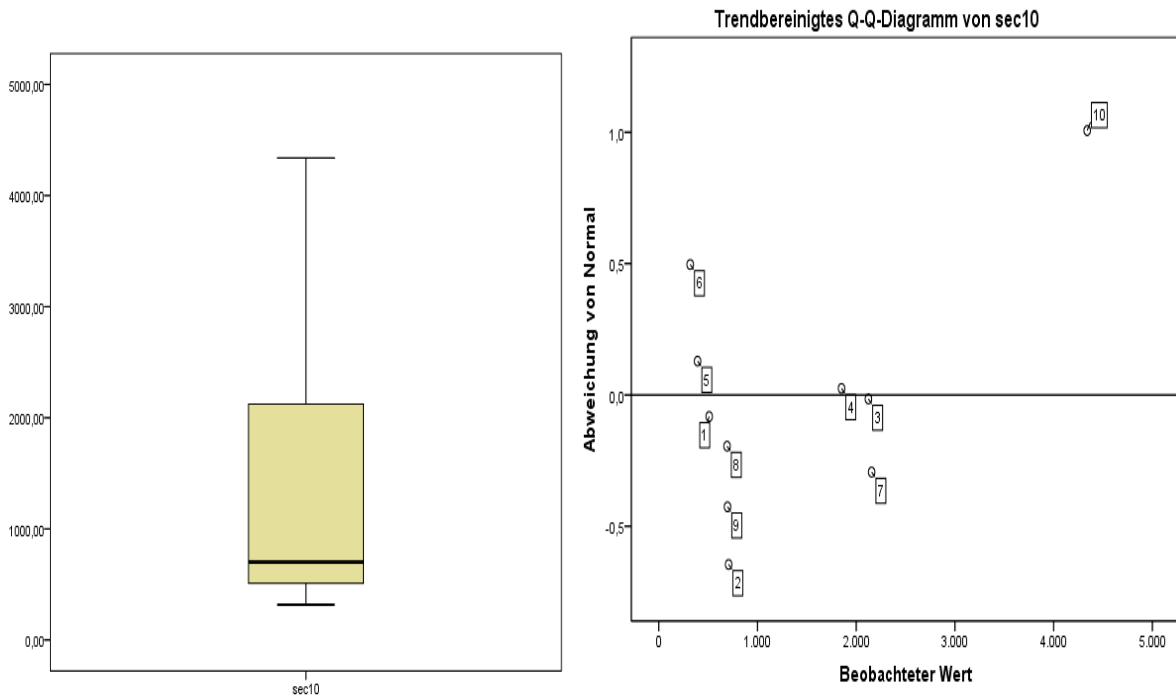


Abbildung 5: Explorative Datenanalyse der Traction-Force-Messwerte

Datenanalyse zu Beginn der Ablösung. Das rechte Diagramm zeigt die Abweichungstendenz vom erwarteten Wert, sodass Fall 10 (> 1 vom Normal entfernt) in folgenden Analysen als ungültiger Fall galt. Der Whisker-Plot (links) zeigt die Analyse der Messwert zum Zeitpunkt 10 s mit Median und 50 %- Wertverteilung dar.

Die Durchschnittswerte der Kraftmessungen pro Messzeitpunkt wurden im Zeitverlauf der Ablösung graphisch und statistisch aufgearbeitet (Abb. 6). Dabei ist tendenziell ein Anstieg der intrazellulären Zugkraft beim Fortschreiten der Ablösung zu beobachten. Zu Beginn ist die durchschnittliche Kraftentwicklung noch diskret, es kommt jedoch phasenweise zu Sprüngen mit größerer Zugkraftzunahme. Mit t-Test an gepaarten Stichproben wurde ein signifikanter Unterschied ($p = 0,026$) der Zugkraftmittelwerte zwischen den Messzeitpunkten 10 s und 180 s nach Trypsin-Zugabe festgestellt. Kurz vor der kompletten Ablösung zeigt sich eine tendenzielle Kraftabnahme ($1000 \text{ dyn/cm}^2 \sim 1 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$).

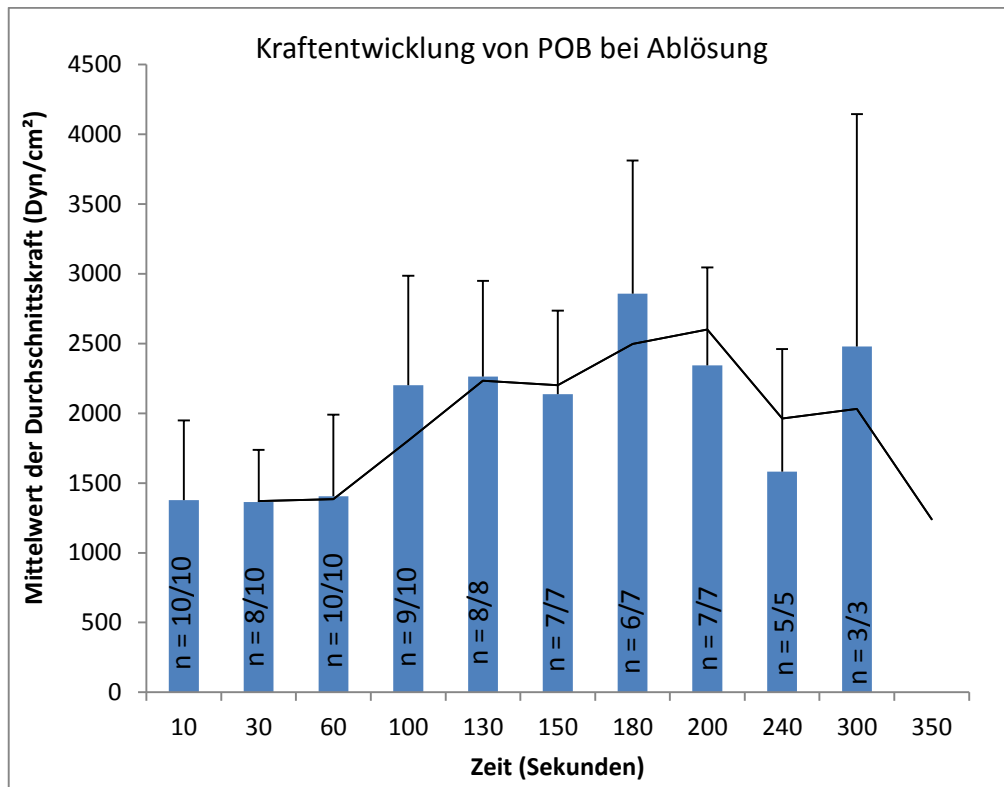


Abbildung 6: Kräfteentwicklung von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB bei der Ablösung mit Trypsin

Die Hälfte der untersuchten Zellen ($n = 5/10$) war nach 240 s noch adhären, nach Ablauf von 350 s waren 90 % der Zellen abgelöst. Für jeden Messzeitpunkt wurden an jeder Zelle ($n_{\text{Messbeginn}} = 10$) 20 Kraftbestimmungen durchgeführt und gemittelt. Dargestellt sind jeweils der Gesamtmittelwerte der Kräfte all der zu dem Messzeitpunkt untersuchten Zellen ($n = \text{Zellen, die an diesem Zeitpunkt analysiert wurden/Zellen, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgelöst waren}$). Die Durchschnittskraft steigt im Ablösungsprozess an, wie die projizierte Nährungskurve zeigt;

3.2 Intrazelluläre Lokalisation von Paxillin in pOB

Erfahrungsgemäß stellen sich fokale Kontakte als punktförmige Strukturen im Zytoplasma dar, die vor allem in der Zellperipherie auftreten (2D Beobachtung, *in vitro*). Im ruhenden Zustand sorgen reifen FA für die Zelladhäsion. Das rekombinante Fusionsprotein eGFP-Paxillin diente der FA-Markierung bei fluoreszenzmikroskopischer Darstellung. Abb. 7 zeigt Paxillin-haltige, fokale, punktförmige und elliptische Strukturen in der Zellperipherie.

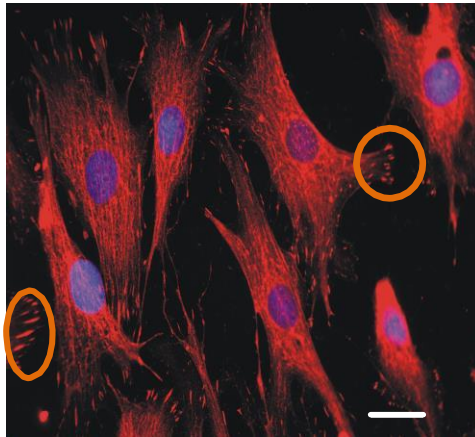


Abbildung 7: Immunzytochemischer Paxillin-Nachweis

Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB (rechts) mit farblich umkreisten Paxillin-haltigen membrannahen Clustern. Eine DAPI Kernfärbung wurde zum Nachweis der Lokalisation der Kerne vorgenommen. Balken 10 μm .

3.3 Fluorescence recovery after photo-bleaching – FRAP

FRAP-Messungen wurden an $n = 4$ eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB durchgeführt, um die Austauschrate von Paxillin in reifen FAs zu bestimmen. Die Paxillin-vermittelte FA-Fluoreszenz wurde bei der Photobleichung (photo bleaching) einem starken Laserimpuls ausgesetzt, sodass die fluoreszierenden Moleküle irreversibel in einen nichtfluoreszierenden Zustand übergingen. Nach einer gewissen Zeit (Recovery) diffundierten neue Paxillin-Moleküle zur gebleichten Stelle. Reintegriertes Paxillin sorgte dann für eine erneute FA-Fluoreszenz. Durch Kontrastverstärkung optimiert zeigt Abb. 8 A (I) die ausgewählte Region im Ausgangsbild. A (II) zeigt den gebleichten Zustand nach dem Laserimpuls: die vorher fluoreszierende Stelle ist verschwunden. A (III) zeigt, dass 60 s nach der Bleichung eGFP-Paxillin wieder in FA integriert wurde. Die Zellen wurden für 200 s beobachtet und die Halbwertszeiten der Wiederauffüllung ($t_{1/2}$) bestimmt (Abb. 8 B). Deren schnelle Komponente betrug im Durchschnitt 8,2 s bei einer Erholungsrate von 95 %, die langsame Komponente betrug 53 s.

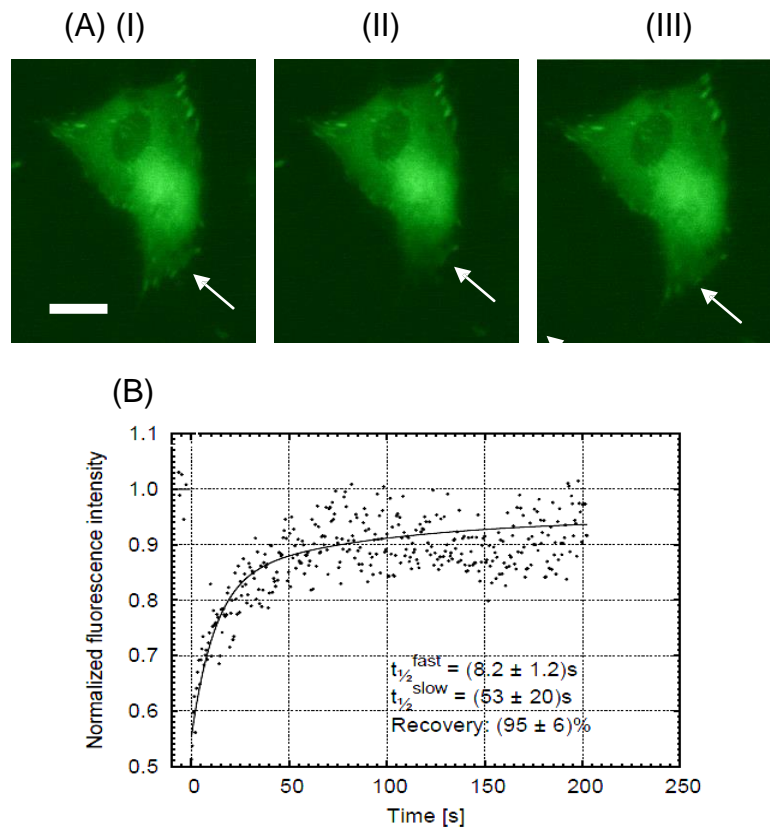


Abbildung 8: Kinetik der Paxillin-Rekrutierung in reifen FA von primären Osteoblasten

Die Abbildung zeigt den Verlauf der eGFP-Paxillin-Rekrutierung in FA von transfizierten pOB. Fluoreszierende FA wurden mit einem Laserstrahl gebleicht und über einen Zeitraum von 200 s beobachtet. Teilabbildung (A) zeigt die kontrastverstärkte Zelle vor (I), direkt nach (II) und 60 s nach dem Bleichvorgang (III); Pfeile identifizieren die gemessene Zielregion. Balken 10 μm . Teilabbildung (B) zeigt die zugehörigen Werte der Fluoreszenzintensitäten im ausgewählten Bleichregion mit einer Näherungskurve sowie den Halbwertszeiten der schnellen und langsamen Wiederauffüllung und den gesamten Recovery-Anteil.

3.4 ATP-Stimulation von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB

EGFP-Paxillin-exprimierende primäre bovine Osteoblasten wurden nach ATP-Aktivierung mit Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie beobachtet. Die Phasenkontrastaufnahme (Abb. 9 A) zeigt das Auftreten dunkler Punkte am Zellrand (Pfeile). Fluoreszenzmikroskopisch (Abb. 9 B) konnten neu entstandene, punkt-förmige Intensitätsanreicherungen in diesen subzellulären Regionen bestätigt werden. Zur Kontrolle wurde eine Zellaktivierung an Zellen durchgeführt,

die statt mit eGFP-Paxillin mit dem Vektor peGFP-N1-STAT-Y701F transfiziert waren und das Fusionsprotein STAT1-GFP anstelle von eGFP-Paxillin exprimierten. Dabei führte ATP-Zugabe zu keiner sichtbaren Veränderung der intrazellulären STAT1-Verteilung. Immunzytochemische Aufnahmen zeigen einige Paxillin-haltige Aggregate in unstimulierten und ein verstärktes Auftreten in stimulierten Zellen; bei stärkerer Vergrößerung ist eine gelegentliche Assoziation dieser Punkte mit terminalen Anteilen filamentärer Strukturen zu erkennen (Abb. 9 D). Um die genaue Lokalisation der Paxillin-haltigen Strukturen zu untersuchen, wurde eine Total-Internal-Reflection-Fluorescence-Mikroskopie (TIRF) durchgeführt (Abb. 9 E). Nach 10-minütiger ATP-Exposition der pOB (n = 6 Zellen) konnte trotz der im Epifluoreszenzbild (grün) erkenntlichen Paxillin-Redistribution bei Bildüberlagerung keine häufige Co-Lokalisation mit dem TIRF-Signal (rot) erfasst werden.

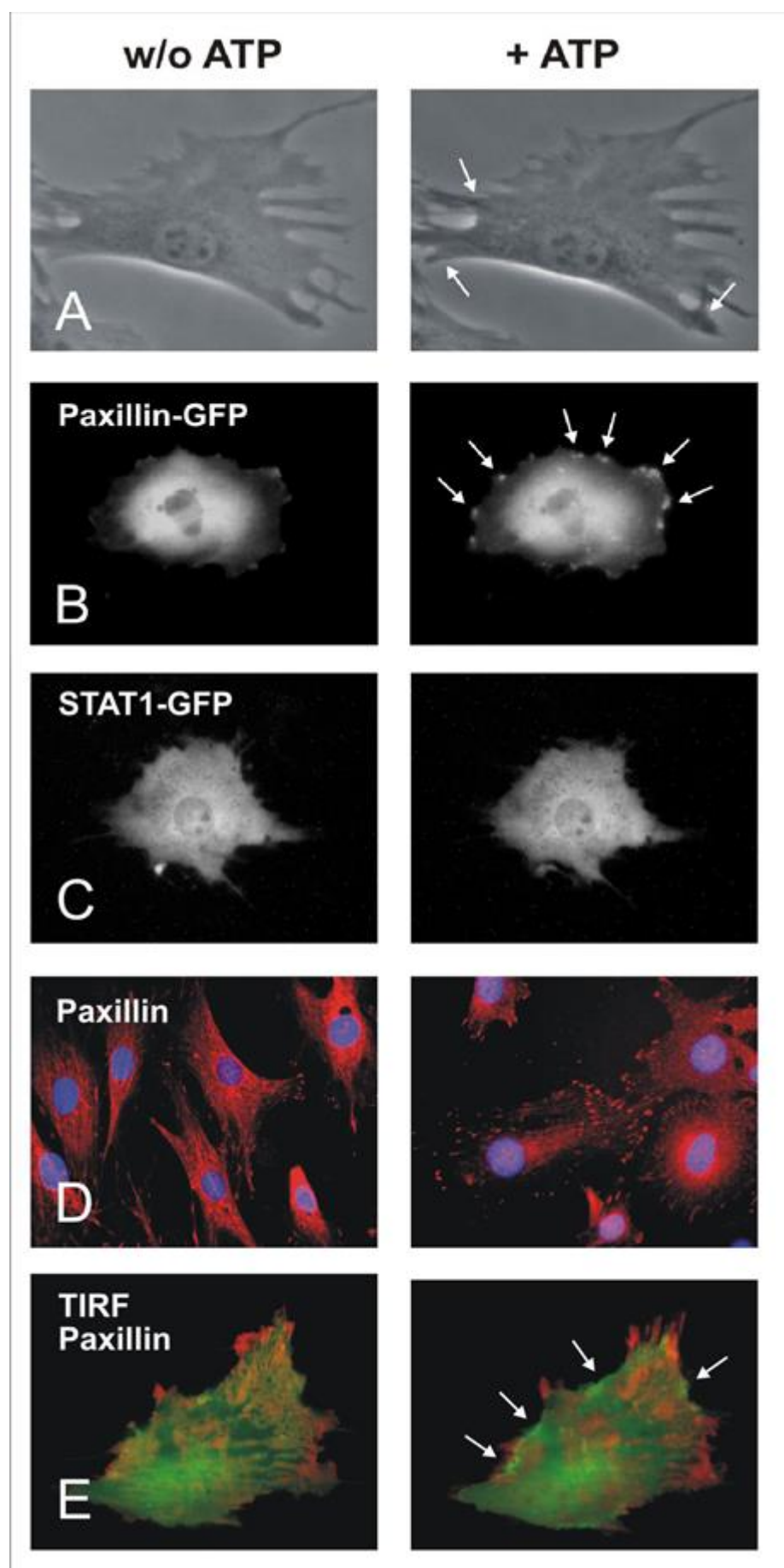


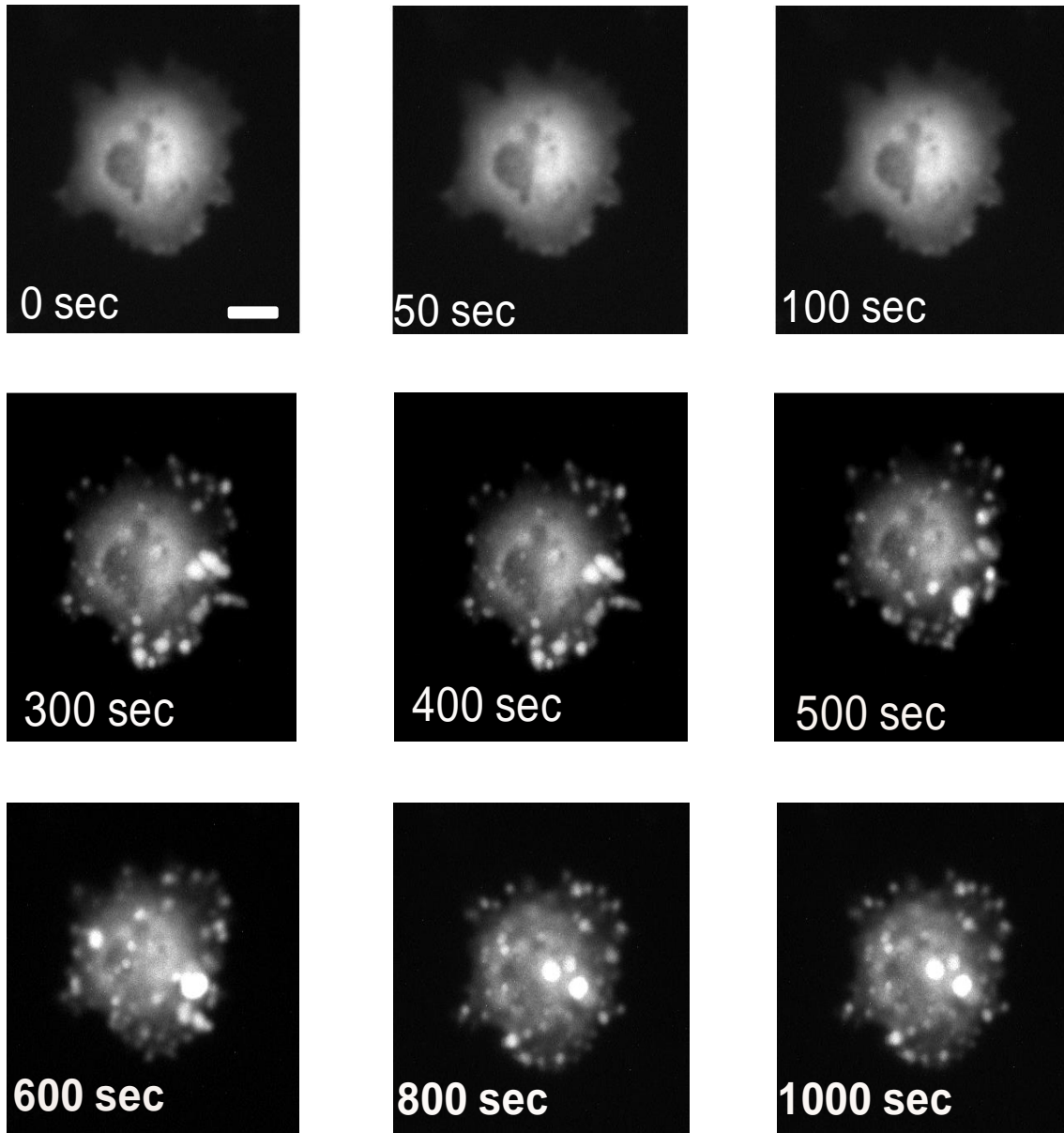
Abbildung 9: Qualitativer Effekte einer Stimulation von primären Osteoblasten mit 100 μ M ATP (rechts) auf die Organisation des Paxillin-enhaltenden Zytoskeletts

(A) Phasenkontrastdarstellung vor (w/o ATP) und nach Exposition (+ATP) von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB. (B) Fluoreszenzaufnahme vor Stimulation und 1000 s danach. Am Zellrand lassen sich hell fluoreszierende Strukturen erkennen. (C) Kontrollexperiment: anstelle von eGFP-Paxillin wurde ein Fusionsprotein aus dem Transkriptionsfaktor STAT1 und eGFP exprimiert; es zeigt sich keine spezifische Veränderung des Zytoskeletts auf ATP. (D) Immunzytochemisch markierte Verteilung von Paxillin in pOB vor und nach ATP-Exposition. (E) eGFP-Paxillin-exprimierende pOB in TIRF vor (links) und 10 Minuten nach ATP-Zugabe (rechts). Es kam zu vermehrter Epifluoreszenz (grün) an den Zellrändern nach ATP-Exposition (Pfeile) bei fehlender Ko-Lokalisation mit TIRF-Signalen (rot). Vergrößerung: 400x.

Als nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Paxillin-Clusterung in eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB nach ATP-Stimulation in Echtzeitmessung betrachtet. Alle 10 s wurden für maximal 300 s nach ATP-Zugabe Fluoreszenzbilder aufgenommen. Dafür wurde pro Versuch eine Zelle mit typischer Morphologie (leicht gestreckt, wenige Zellausläufer, nicht apoptotisch abgerundet, moderate Paxillin-Aggregat-Präsenz im unstimulierten Zustand) ausgewählt. Mit ATP wurden insgesamt 51 Zellen stimuliert, 26 Zellen wurden mit Bradykinin aktiviert und an 4 Zellen die Kontrolllösung ausgetestet. Die erwartete Zellreaktion war die *de novo* Ausbildung von eGFP-Paxillin-anreichernden punktförmigen Aggregaten. Die qualitative Bewertung dieser Reaktionen erfolge in 3 Abstufungen: keine sichtbare Reaktion, sichtbare Aktivierung und starke Reaktion.

Von 51 ATP-stimulierten Zellen zeigten 30 (58,8 %) eine sichtbare Reaktion, bei 13 Zellen (25,5 %) kam es zu einer starken Reaktion und bei 15,7 % kam es zu keiner sichtbaren Reaktion. Abb. 10 zeigt exemplarisch die Bildserie einer eGFP-Paxillin-exprimierenden Zelle bei ATP-Zugabe mit starker Reaktion. Im Ausgangsbild kann man in der Zellperipherie rundliche Strukturen höherer Intensität erkennen, die am ehesten als reife stabile fokale Adhäsionskomplexe zu identifizieren sind. Zu einer deutlichen Paxillin-Clusterung kommt es erst nach 100 s. Im Beobachtungsverlauf von 1200 s kommt es zu einer deutlichen Zunahme dieser Paxillin-enhaltenden Strukturen, danach lässt deren Neubildung gemessen an Zahl und Größe nach. Die Mehrzahl dieser Strukturen löste

sich rasch wieder auf, während neue aufkeimten; nur ein kleiner Anteil konvergierte zu größeren Konglomeraten. Insgesamt kam es zu einer schnellen, transienten Paxillin-Redistribution bei ATP-Stimulation in neugeformte, dynamische Aggregate.



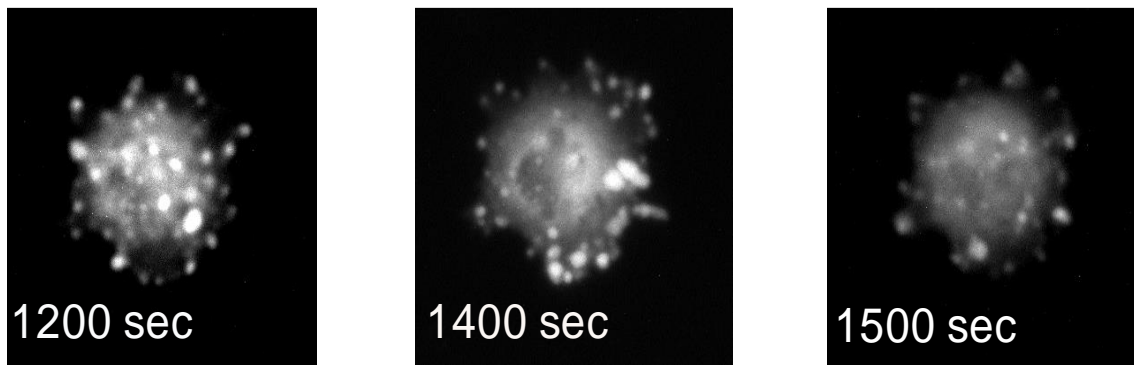


Abbildung 10: Bildserie eines eGFP-Paxillin-aggregierenden Osteoblasten nach ATP- Stimulation

Bei Stimulation mit 100 μ M ATP kommt es zur Ausbildung punkt- bis elliptisch geformter Strukturen hoher Fluoreszenzintensität, die als neugebildete, Paxillin-haltige Aggregate zu identifizieren sind. Deutliche Neuformationen treten erst ab 100 s nach Aktivierung auf, nach einer Progredienz der Neuformation kommt es nach 1200 s zu einer Abnahme der Paxillin-Cluster. Balken 10 μ m.

Zur mengenmäßigen Beurteilung der neuauftretenden FA wurden diese in $n = 4$ repräsentativen, aktivierten pOB zu ausgewählten Zeitpunkten manuell ausgezählt. Um Zählfehler auszugleichen, wurde die Zählung wiederholt und gemittelt. In Abb. 11 kann man im Verlauf einen recht schnellen Anstieg und lang-samen Abfall der Anzahl dieser Paxillin-Cluster erkennen. Numerische Unterschiede im Zeitverlauf wurden mit einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von der Holm-Sidak-Analyse validiert. Die Dauer von Assemblierung und Disassemblierung der Paxillin-haltigen Membranstrukturen wurde durch nichtparametrische Tests analysiert. Die zeitabhängige Änderung in der Anzahl der Paxillin-enthaltenden Aggregate war demnach statistisch relevant ($p < 0,001$).

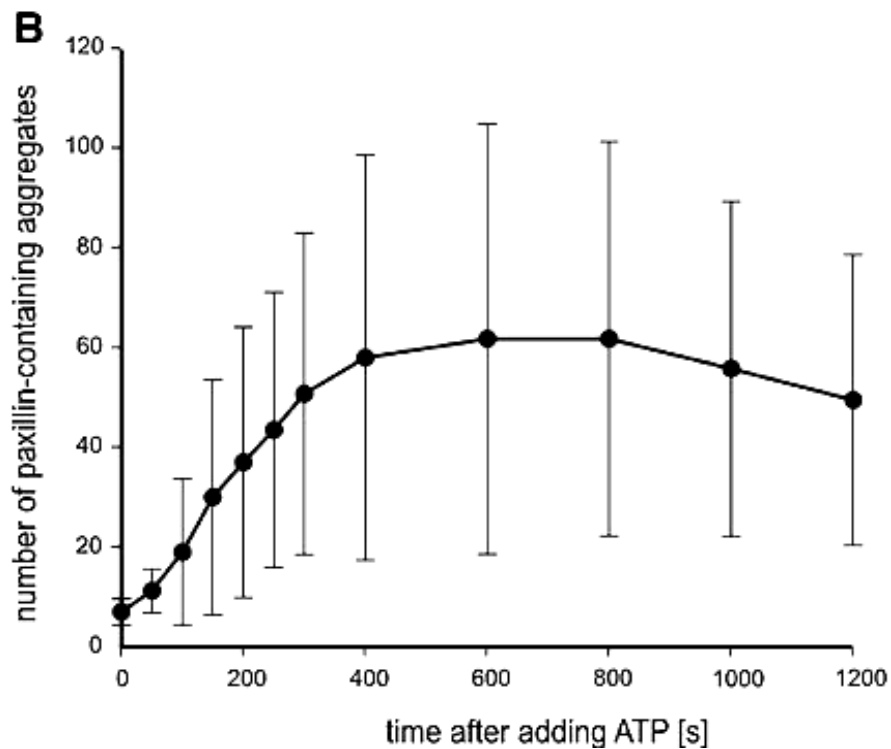


Abbildung 11: Zeitabhängige Entwicklung der Anzahl Paxillin-haltigen Aggregate in ATP- stimulierten Osteoblasten

Die Kurve zeigt Mittelwerte der über die Zeit nach ATP-Stimulation gezählten Paxillin-haltigen Aggregate, gemittelt aus 4 repräsentativen Zellen. Sichtbar wird ein deutlicher Anstieg von Paxillin-Cluster nach Aktivierung mit ATP mit dezenter Plateaubildung, gefolgt von einer Abnahme der Anzahl der Aggregate.

Wegen der zeitverzögerten Zellreaktion wurden die ersten 50 s der obigen Zelle im Abstand von 10 s nach der ATP-Aktivierung betrachtet (Abb. 12). Augenscheinlich beginnt die Neuausbildung von FA nicht innerhalb dieser frühen Phase.

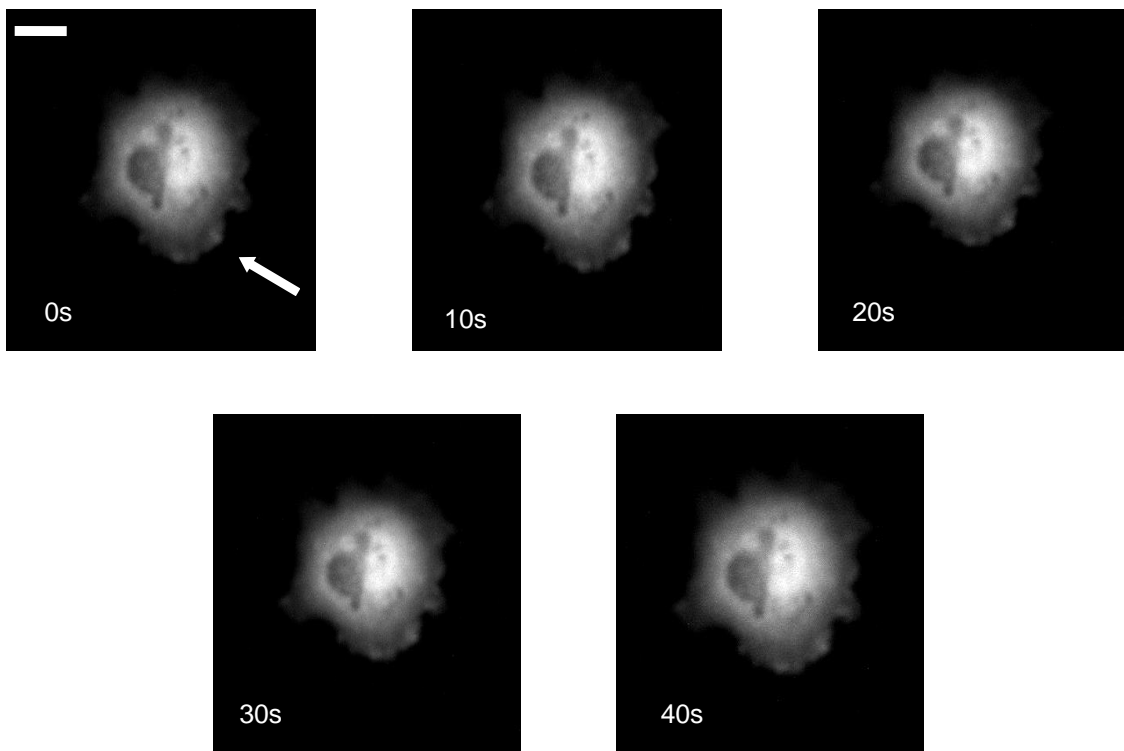


Abbildung 12: Fehlende Paxillin-Clusterung in den ersten 40 s nach ATP-Stimulation

EGFP-Paxillin-exprimierender Osteoblast während der ersten 40 Sekunden nach der Exposition mit ATP. Neben reifen FA (weißer Pfeil) sind keine *de novo* entstandenen Paxillin-Cluster nachweisbar. Balken 10 μm .

Die Zeitrafferaufnahmen nach ATP-Stimulation von vier GFP-Paxillin-exprimierenden pOB wurden hinsichtlich der Veränderung der Fluoreszenzintensität ausgewertet. Je nach Verwertbarkeit wurden retrospektiv pro Zelle zwischen 6 und 70 analysierbare Paxillin-Cluster ausgewählt und die individuelle Intensitätsänderung bestimmt. Es konnten nur solche Pixel zur Analyse genutzt werden, die sich in Ihrer Fluoreszenzintensität deutlich abgrenzten und im Verlauf der Beobachtungsspanne von 400 s kein Plateau der Intensität erreichten, also solche deren Helligkeit sich im Verlauf eindeutig entwickelte und dann wieder abnahm. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass tatsächlich ATP-induzierte, dynamische Cluster und nicht vorbestehende, reife FA in die Analyse einfließen. Pro Zelle wurden $37,5 \pm 32$ solcher Komplexe identifiziert (Abb. 13). Die Fluoreszenzintensität jedes Pixels wurde in Zeitabhängigkeit gemessen und als integrierte Kurve so dargestellt, dass der Kurvenschwerpunkt bei 0 s lag. Die Kurven

aller analysierten Pixel einer Zelle wurden zusammengefasst und gemittelt. Für die Fluoreszenzintensität wurde eine normierte Skala mit dem Maximalwert von 1 eingeführt. Die mittlere Lebensspanne ATP-induzierter Strukturen konnte demnach über die Halbwertszeit für die Aggregat-Assoziation bis zur Maximalintensität und über die analoge Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit veranschaulicht werden. Von den vier analysierten Zellen wurden die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ als Mittelwerte gebildet: es wurde eine mittlere Halbwertszeit bei der Entstehung von 49 ± 9 s und bei der Dissoziation von 101 ± 28 s bestimmt. Abb. 14 zeigt die genormte Intensitätskurve der FA einer Zelle bei ATP-Aktivierung.

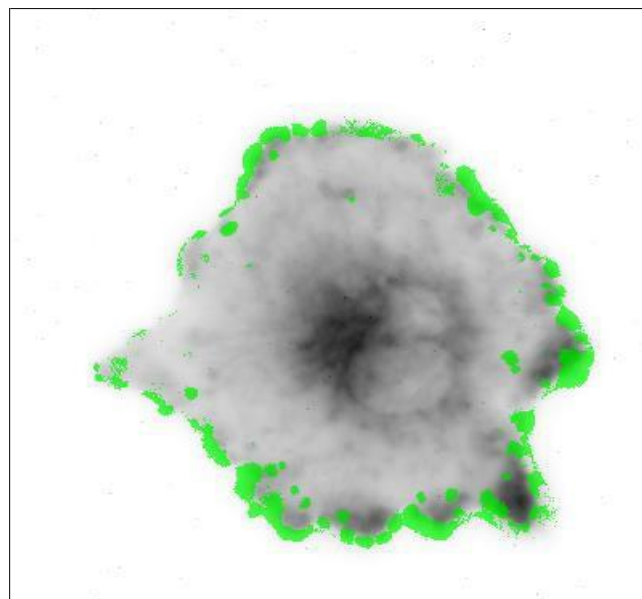


Abbildung 13: Peripher gelegene Komplexe aus eGFP-Paxillin nach ATP-Stimulation von Zellen

Fluoreszenzbilder aus den Zeitrafferaufnahmen einer ATP-induzierten Paxillin-Umverteilung wurden einem monochromen Bild überlagert. Die induzierbaren peripher gelegenen Paxillin-Cluster ab der Aktivierung bis zum Beobachtungsende sind in grün markiert.

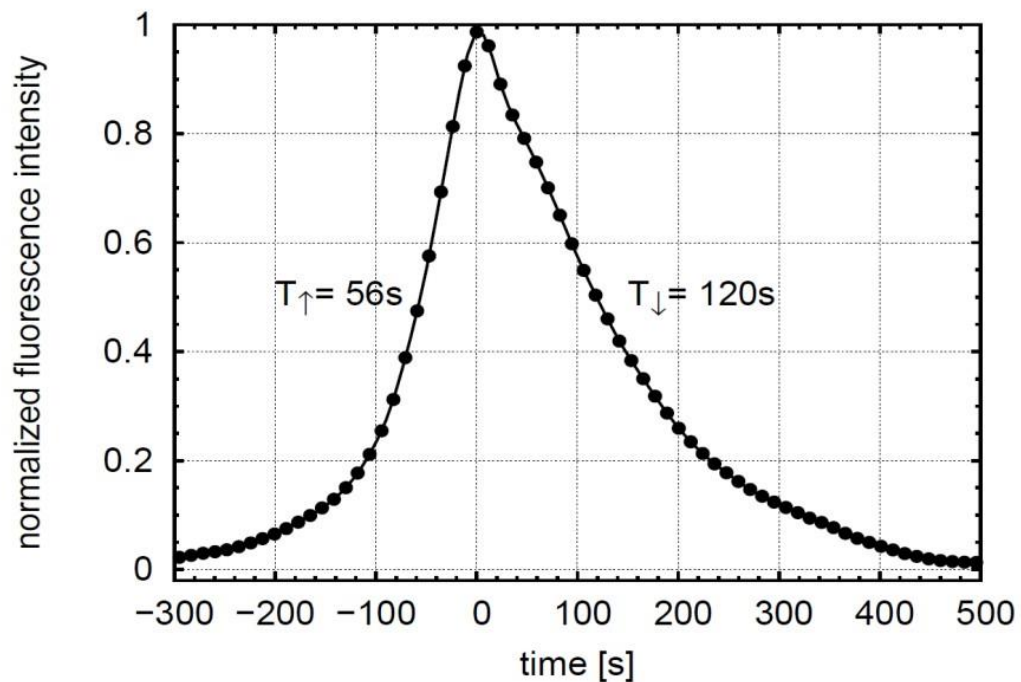


Abbildung 14: Durchschnittliche Kinetik der Entstehung Paxillin-enhaltender Komplexe in ATP-stimulierten Osteoblasten

Gezeigt ist der normierte Lebenszyklus eines typischen Paxillin-Clusters nach Stimulation von pOB mit ATP, gemessen anhand der lokalen Fluoreszenzintensitäten. Es konnte eine durchschnittliche Aggregationshalbwertszeit von $49 \pm 9\text{ s}$ und eine durchschnittliche Dissoziationshalbwertszeit von $101 \pm 28\text{ s}$ errechnet werden ($n = 4$; $p = 0,029$).

3.5 Paxillin-Umverteilung in Bradykinin-stimulierten pOB

Im Weiteren wurden 29 Zellen mit Bradykinin aktiviert: davon kam es bei 4 Zellen zu keiner Reaktion (13,8%), bei 12 Zellen zu sichtbaren (41,4%) und bei 13 Zellen zu starken Reaktionen (44,8%). Abb. 15 zeigt exemplarisch die Bildserie eines Bradykinin-stimulierten pOB mit starker Reaktion. 100 Sekunden nach Aktivierung startete die *de novo* Bildung von Paxillin-enhaltenden Komplexen in der Zellperipherie. Abb. 16 stellt die ersten 50 s der Aktivierung detaillierter dar. Reife FA bleiben bestehen, neue sind in dieser frühen Phase noch nicht sichtbar. Abb. 17 zeigt einen besonders reaktiven Bradykinin-behandelten pOB zu drei Zeitpunkten: Es bilden sich bei langer Reaktionsdauer viele, größere

Aggregate über die ganze Zelle verteilt aus.

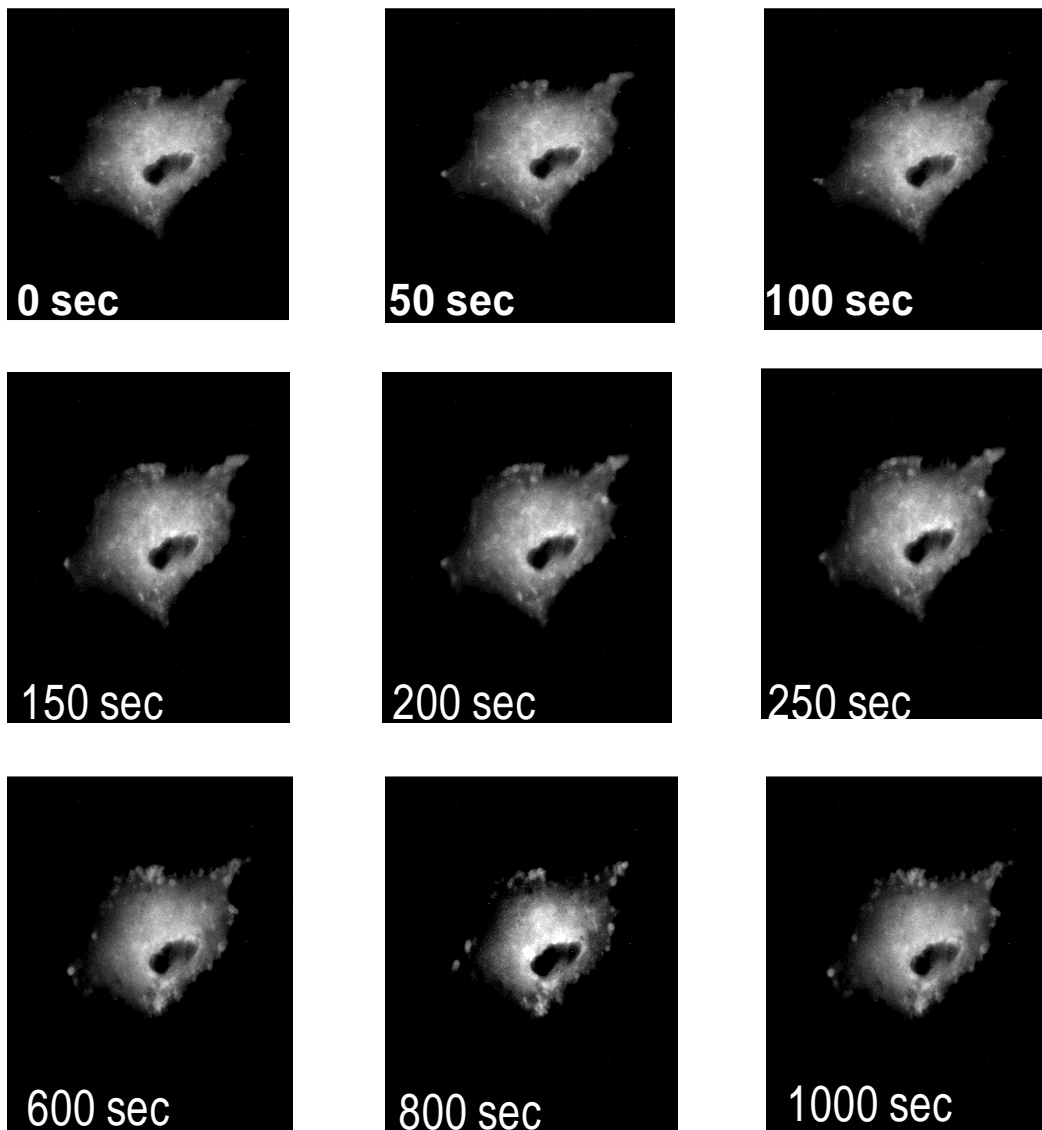


Abbildung 15: Subzelluläre eGFP-Paxillin-Umverteilung nach Stimulation mit Bradykinin
Die fluoreszenzmikroskopische Bildserie demonstriert die Ausbildung punkt- bis elliptisch-geformter, peripher gelegener GFP-Paxillin-enthaltender Cluster von hoher Fluoreszenzintensität. Deutliche Clusterbildung trat erst nach Ablauf von 100 s nach Bradykinin-Exposition auf. Balken 10 μm ;

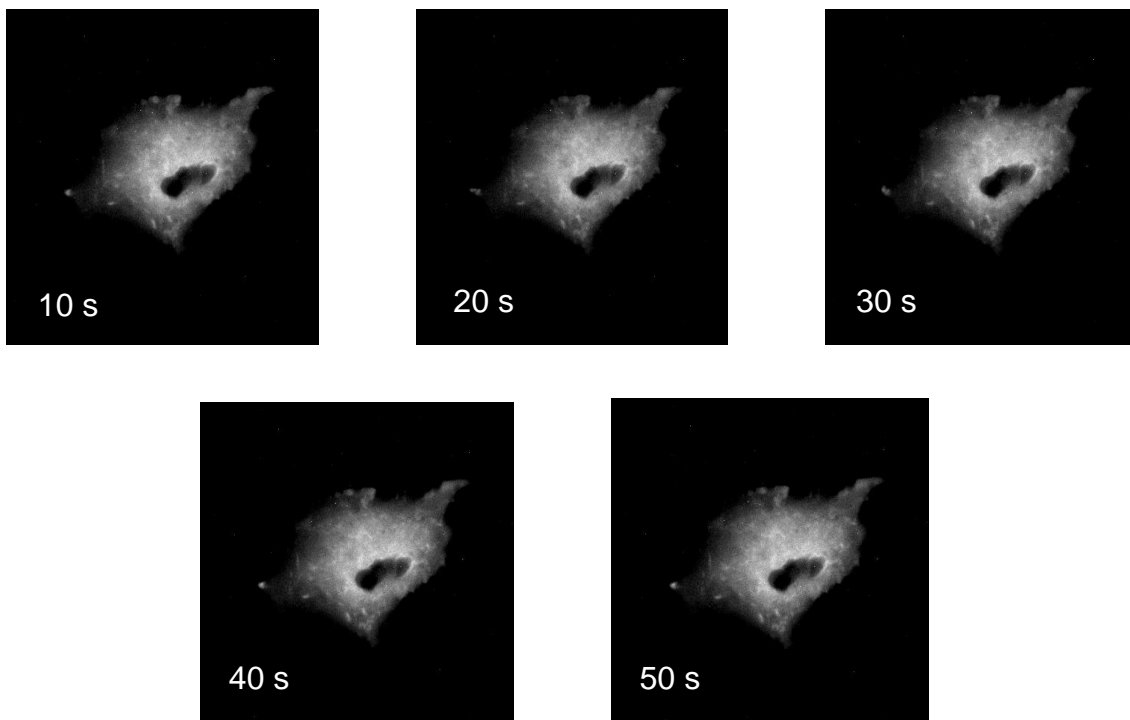


Abbildung 16: Fehlende Umverteilung von eGFP-Paxillin in der frühen Phase nach Bradykinin- Behandlung

Darstellung derselben Zelle wie in Abb. 15 in den ersten 40 Sekunden nach der Aktivierung mit Bradykinin. In diesem frühen Stadium können keine nennenswerten Neuformationen beobachtet werden. Eine deutliche Reaktion zeigt sich erst jenseits der 50 Sekunden-Marke.

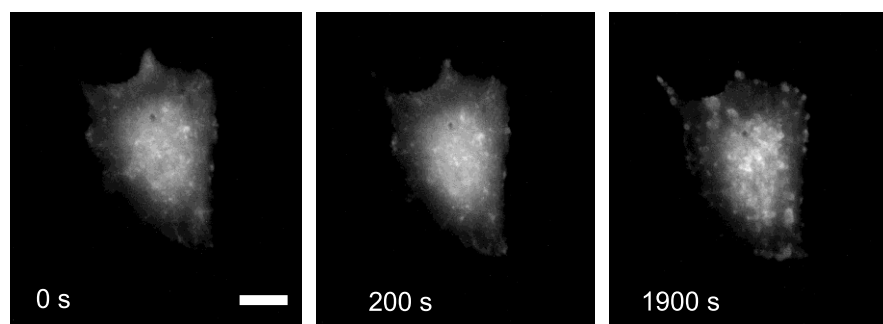


Abbildung 1 Paxillin-Redistribution in der Spätphase nach Bradykinin-Stimulation

Gezeigt ist die Bradykinin-induzierte Umverteilung von Paxillin in einem eGFP-Paxillin-exprimierenden Osteoblasten über längere Beobachtungszeit. Balken 10 μm .

Analog zum ATP-Versuch wurde die Anzahl der neugebildeten Punktformationen

pro Messzeitpunkt von $n = 3$ Versuchszellen gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 18). Durch ANOVA mit Messwiederholung konnte ein signifikanter Anstieg der Anzahl eGFP-enhaltender Aggregate in pOB im Aktivierungsverlauf festgestellt werden. Der Post-hoc Tukey-Test, der einen paarweisen Wertvergleich darstellt, ergab einen signifikanten Unterschied zwischen dem Startwert und dem Messzeitpunkt 600 s.

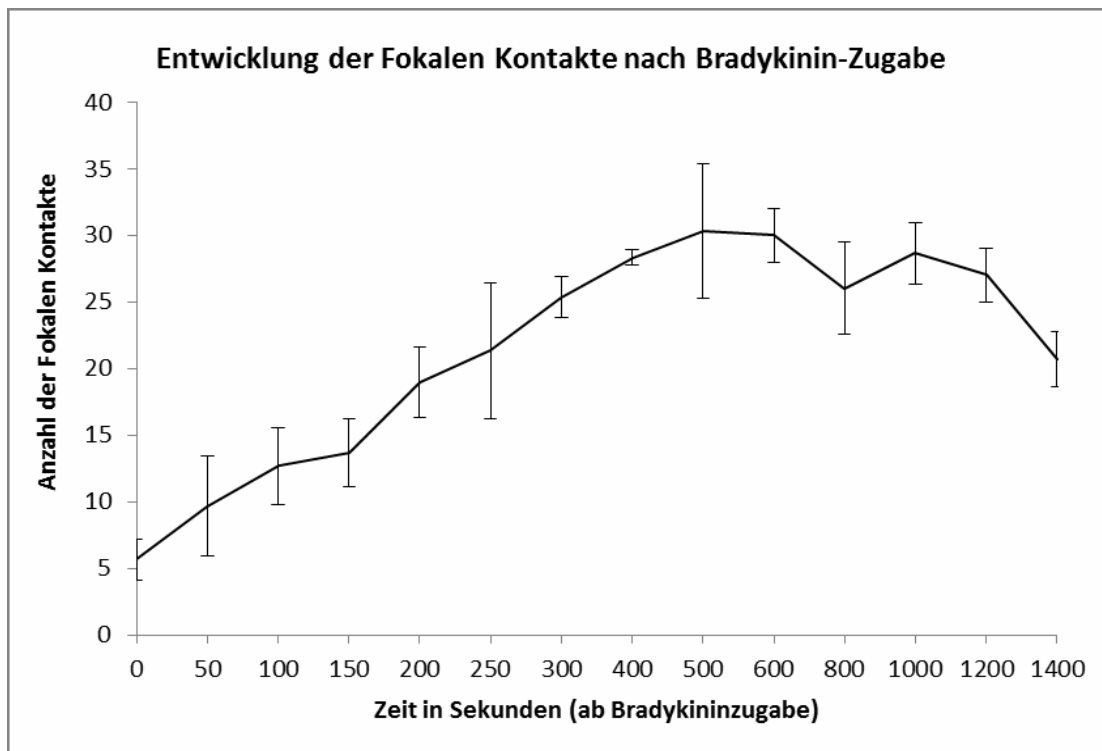


Abbildung 18: Zeitverlauf der Zunahme in der Anzahl punktförmiger Paxillin-Aggregate als Folge einer Stimulation primärer Osteoblasten mit Bradykinin

Gezeigt ist die Quantifizierung der Anzahl von Paxillin-Clustern im Verlauf einer Bradykinin-Behandlung. Nach der Aktivierung kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Clusterbildung, gefolgt von einer dezenten Plateaubildung und folgendem Abfall.

Zur Kontrolle wurde gleichvolumiges Ham's-F10-Medium ohne Aktivatoren zu den mit eGFP-Paxillin-kodierendem Plasmid transfizierten pOB ($n = 4$) pipettiert, um auszuschließen, dass z.B. die mechanische Manipulation der Zelle während der Aktivatorzugabe die Clusterbildung bewirkt. Abb. 19 zeigt die zugehörige Bildserie (1000 s), wobei keine neugebildeten Strukturen oder andere Zellveränderungen auftraten.

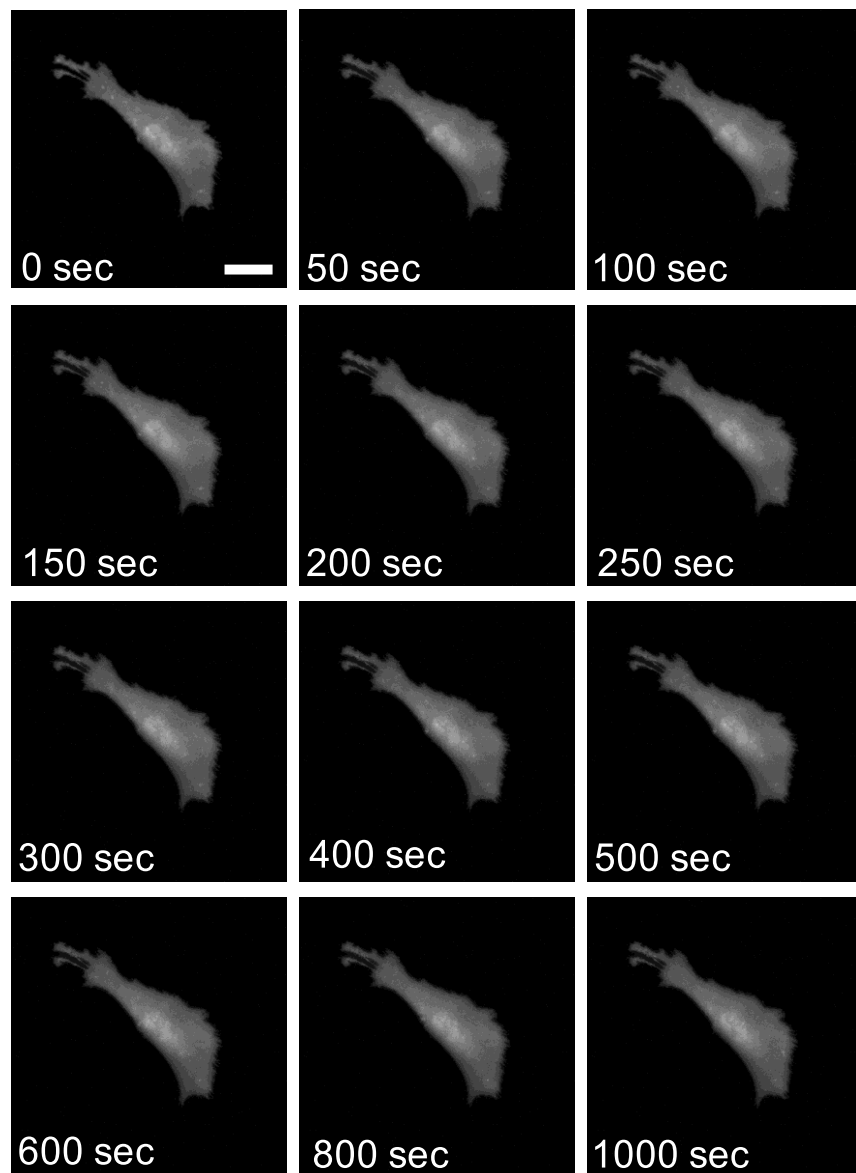


Abbildung 19: Zugabe Aktivator-freier Kontroll-Lösung zu eGFP-Paxillin-exprimierenden Osteoblasten

Bildserie eines mit einem eGFP-Paxillin-kodierenden Plasmids transfizierten pOB nach Zugabe einer Kontrolllösung von Ham's-F10-Medium (Start der Kontroll-Behandlung zum Zeitpunkt 0 s). Es kommt zu keinen sichtbaren Clusterbildungen oder andersartigen Zellreaktion. Balken 10 μm .

Als zweites Kontrollexperiment wurden pOB ($n = 4$) mit einem alternativen Vektor (kodierend für STAT1-eGFP) transfiziert, sodass nicht Paxillin sondern der für den Versuch unbedeutender Transkriptionsfaktor STAT1 markiert war. Gemäß der Versuchsbeschreibung wurde die ATP-Stimulation durchgeführt. Um eine

Vergleichbarkeit zu gewährleiten wurde ein identischer Versuchshergang gewährleistet. Wie in Abb. 20 deutlich zu erkennen ist, kommt es im Verlauf der 800 s zu keiner dem Hauptversuch vergleichbaren Reaktion. Die Zelle reagiert einzig mit einer gewissen Kontraktion.

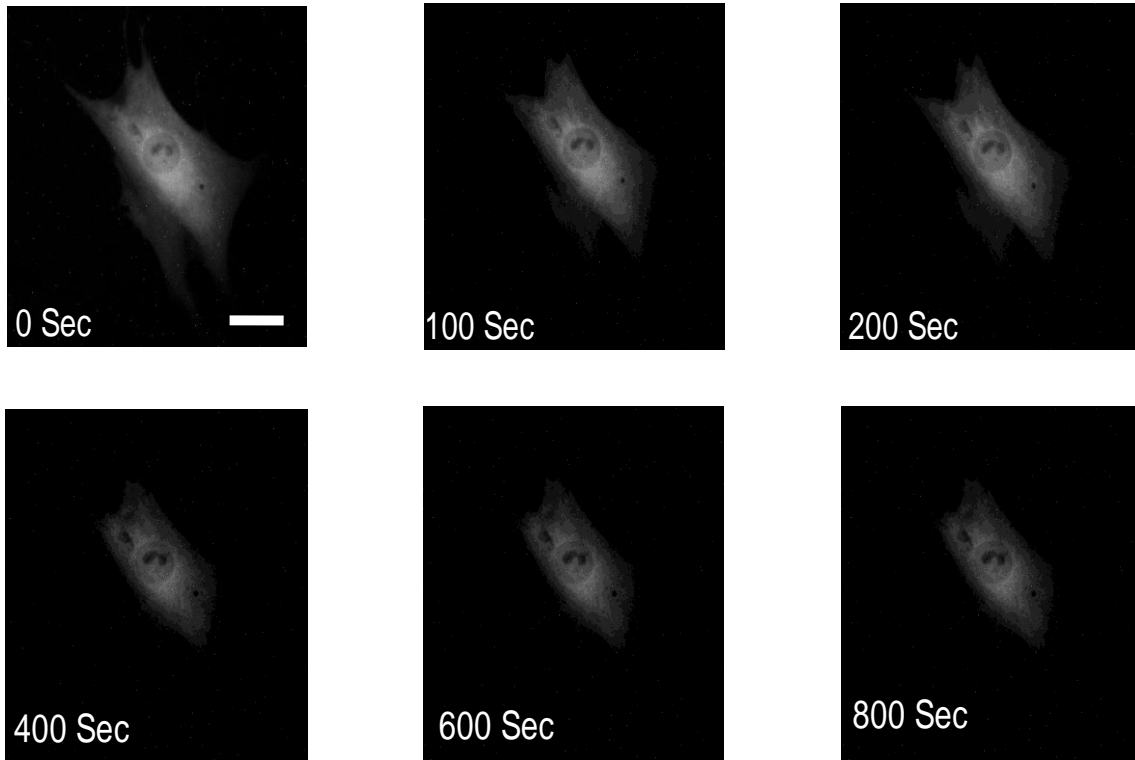


Abbildung 20: ATP-Aktivierung an kontroll-transfizierten Osteoblasten

Zu sehen ist die Behandlung eines STAT1-Y701F-eGFP-exprimierenden pOB mit 100 μ M ATP zu ausgewählten Zeitpunkten über eine Aufzeichnungszeit von 800 s. Hier kam es zu keiner detektierbaren Veränderung in der panzellulären Verteilung von STAT1. Balken 10 μ m.

3.6 Analyse der Kalziumkonzentration in pOB bei Stimulation

Nicht-transfizierte pOB wurden mit Fura-2AM angefärbt, um Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration bei chemischer Aktivierung zu messen. Insgesamt wurden 90 Zellen mit ATP aktiviert, 91 mit Bradykinin und bei 12 Zellen wurde HEPES-Lösung als Kontrolle verwendet. Dabei wurde das Metafluor Programm in Windows 2000 verwendet. Die Fluoreszenzintensität der im Sichtfeld ausgewählten Zellen wurde mit einer Frequenz von 1 Hz bei Anregung mit 340 nm und 380 nm aufgenommen und die F_{340}/F_{380} -Ratio ermittelt. Bei Anregung mit blauem Licht sind die Zellen durch die Fura-2AM-Färbung im unstimulierten Zustand violett. Steigt der Kalziumgehalt der Zelle, kommt es zur Farbaufhellung und Türkisfärbung der Zellen, da durch die Komplexbildung die Farbgebung bzw. Emissionsintensität wechselt. Abb. 21 zeigt Aufnahmen vor (A) und 159 s (B) nach einer ATP-Aktivierung. In (B) erkennt man die farbliche Veränderung im Vergleich zum Ausgangsbild, was qualitativ einen intrazellulären Kalziumanstieg signalisiert.

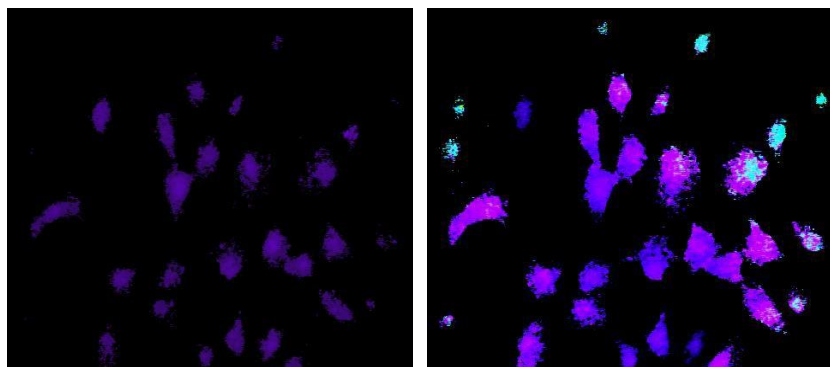


Abbildung 21: Qualitativer Kalziumanstieg in Osteoblasten als Folge einer ATP-Behandlung

Fluoreszenzbilder von Fura-2AM-gefärbten pOB vor (links) und 159 s nach (rechts) Behandlung mit ATP; der induzierte Kalziumanstieg führt über Fura-2AM-Komplexierung zur Wellenlängen-Veränderung der emittierten Fluoreszenz.

Durch die quantitative Erfassung der emittierten Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 340 nm und 380 nm konnten $F_{380\text{min}}/F_{380\text{max}}$ -Ratio und zeitabhängige Intensitätsverläufe erstellt werden. Bei 340 nm kommt es zum Absorptionsmaximum der kalziumbindenden Fura-2AM-Moleküle. Abb. 22A zeigt die F_{340} -Verläufe der farblich markierten Zellen einer Versuchsgruppe mit deutlicher Zunahme bei Aktivierung (weißer Marker), die schnell eintritt und sich nach dem Maximum wieder dem Hintergrundwert annähert. Komplementär kommt es bei der Anregung mit 380 nm (Abb. 22 B) und somit dem Absorptionsmaximum des ungebundenen Fura-2AM durch ATP- Aktivierung zu einem Intensitätsabfall. Ungebundenes Fura-2AM fällt ab, da die Aktivierung über den Kalziumanstieg die Komplexbildung des Farbstoffs bewirkte.

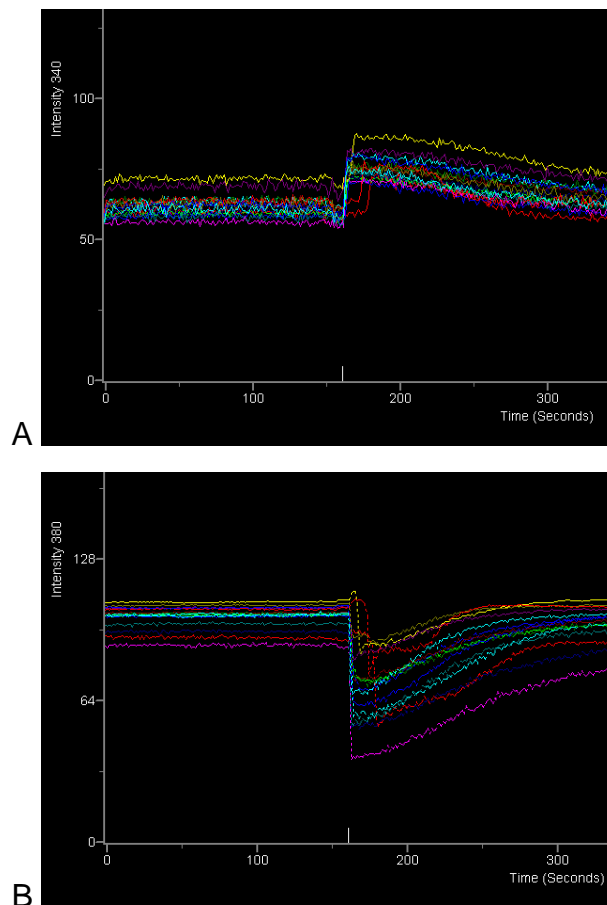


Abbildung 22: Fura-2AM-gefärbte primäre Osteoblasten reagieren mit intrazellulärem Kalziumanstieg auf ATP-Stimulation

Teilabbildung (A) zeigt den Fluoreszenzanstieg bei 340 nm Anregung der Fura-2AM-gefärbten

pOB bei ATP-Behandlung (weiße Strichmarkierung bei 165 s) durch den ATP-vermittelten Kalziumanstieg und Fura-2AM-Komplexierung. (B) zeigt den analogen Fluoreszenzabfall bei 380 nm Anregung, da ungebundenes Fura-2AM sinkt.

Aus den Daten der Anregungen mit 340 nm und 380 nm konnte der Ratioverlauf ermittelt werden (Abb. 23). Durch F₃₄₀-Anstieg und F₃₈₀-Abfall ergibt sich ein Anstieg der Ratio bei Aktivierung in Form eines Höhepunkts.

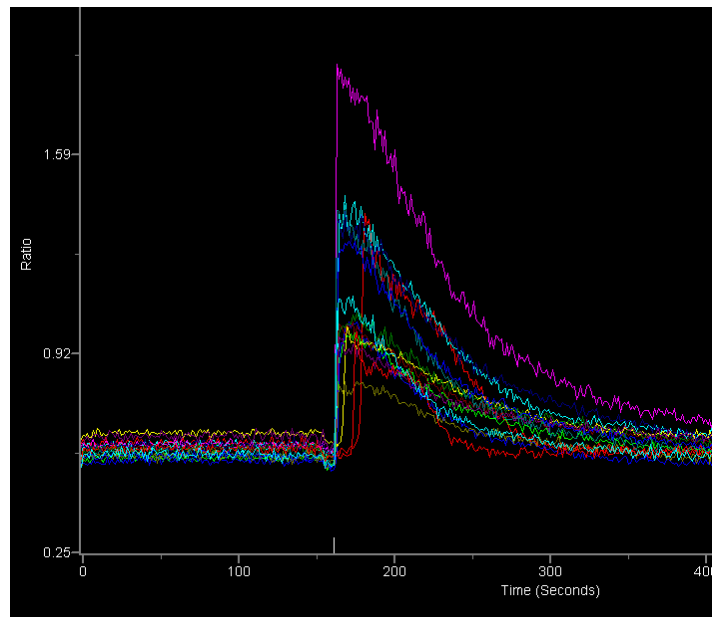


Abbildung 23: Anstieg der F_{340}/F_{380} -Ratio von Fura-2AM-gefärbten Osteoblasten nach ATP Stimulation

Verlauf der F_{340}/F_{380} -Ratiowerte in mehreren Fura-2AM-gefärbten pOB (dargestellt in unterschiedlicher Farbmarkierung) bei ATP-Aktivierung (weiße Markierung). Der steile Ratio-Anstieg aller untersuchten Zellen porträtiert einen Liganden-vermittelten Kalziumanstieg.

In Excel wurden die F_{340}/F_{380} -Ratiowerte der 90 untersuchten Zellen gemittelt und mit Standardabweichung in Zeitabhängigkeit abgebildet (Abb. 24). Die Aktivator-Zugabe wurde dem Zeitpunkt 0 s gleichgesetzt. Bei Betrachtung des ATP-induzierten Maximalwerts der F_{340}/F_{380} -Ratio kam es insgesamt zu einer Wertverdopplung. 17 Sekunden nach der Aktivierung kam es zum Höchstwert der F_{340}/F_{380} -Ratio_{max} von 0,998. Der Unterschied zwischen der basalen Ratio und der induzierten Ratio_{max} war im t-Test signifikant, genauso wie die Änderungen

des Kalziumspiegels im Zeitverlauf, was mittels ANOVA gefolgt vom Tukey-Tests berechnet wurde.

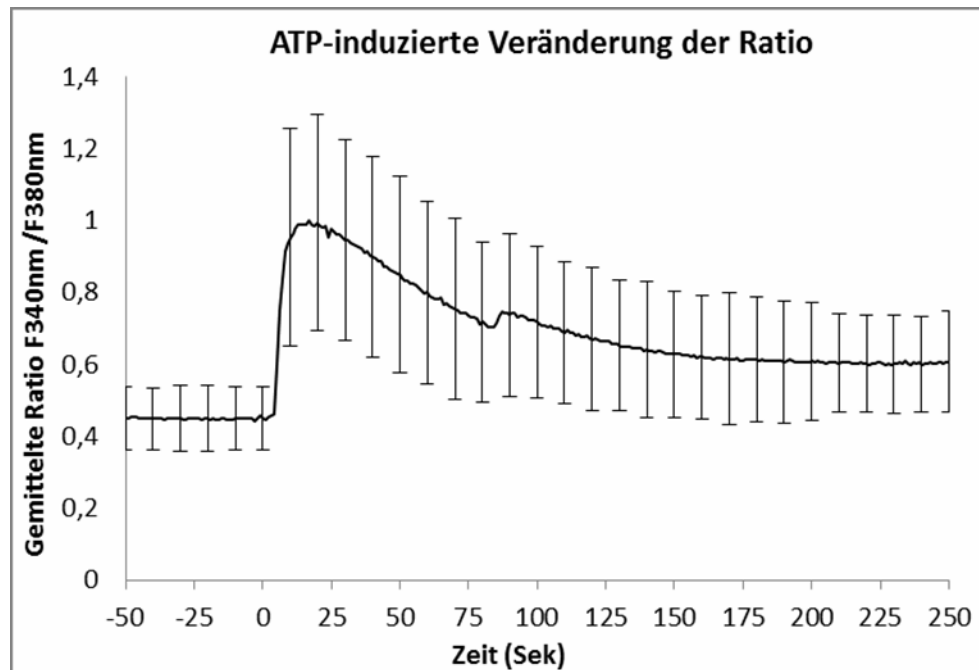


Abbildung 24: Zeitverlauf der ATP-induzierten Änderungen der F_{340}/F_{380} -Ratio in Fura-2AM- gefärbten Zellen

Für jede 10. Sekunde wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der F_{340}/F_{380} -Ratiowerte abgebildet ($n = 90$), wobei die Ratio eine Messgröße der intrazellulären Kalziumkonzentration ist.

Den ATP-Aktivierungsversuchen entsprechend wurde die Ratioanalyse auch bei den Versuchen mit Bradykinin-Stimulation durchgeführt. Auf die Abbildung der entsprechenden Intensitätsgraphen soll hier verzichtet werden, da sie zu den ATP-induzierten Graphen analog waren. Die Ratio-Mittelwerte von 76 Bradykinin-stimulierten Zellen wurden gegen die Zeit aufgetragen, sodass die Latenz (18 s) bis zum ebenfalls eingetretenen $Ratio_{max}$ von 0,81 registriert werden konnte (Abb. 25). Aus technischen Gründen wurden die Messungen meist vor Ablauf von 200 s beendet, die abfallende Tendenz ist jedoch auch bei diesem verkürzten Versuchsaufbau eindeutig. Die Bradykinin-induzierte Differenz zwischen $Ratio_{max}$ und dem gemittelten Ratio-Basalwert war einem gepaarten t-Test zufolge hochsignifikant.

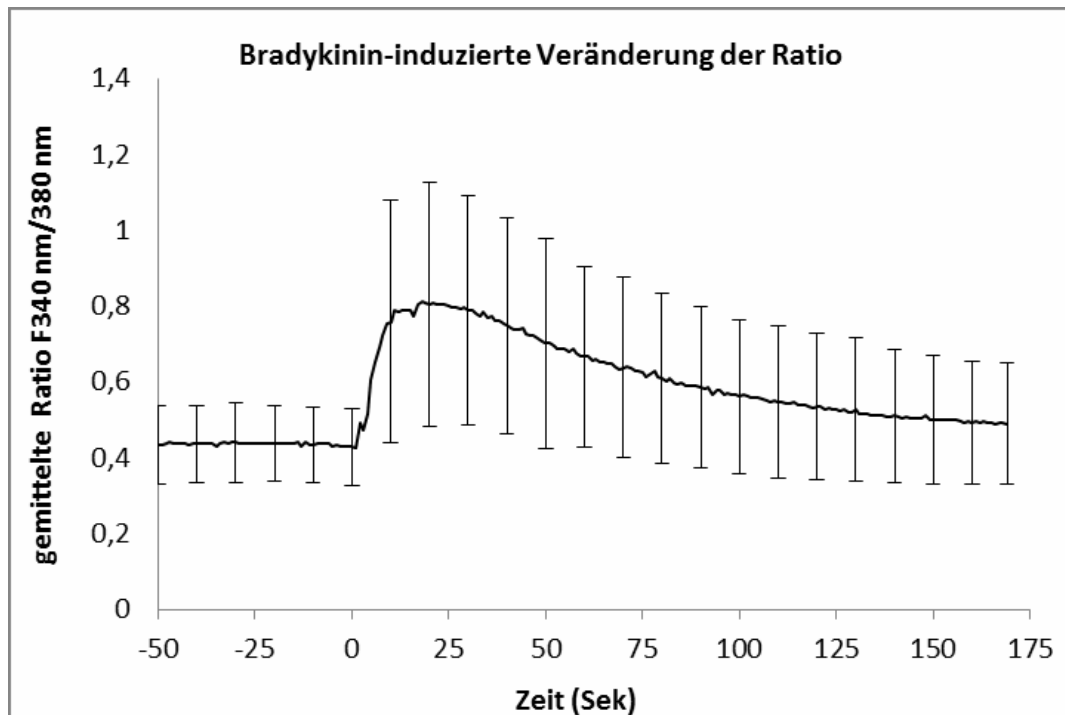


Abbildung 25: Bradykinin-induzierte Änderung der F_{340}/F_{380} -Ratio von Fura-2AM-gefärbten Zellen

Der Ratio-Anstieg entspricht der Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration unmittelbar nach Beginn der Behandlung mit Bradykinin ($n = 76$ Zellen). Der maximale Peak der Kalziumkonzentration wurde nach 18 s erreicht.

Bei explorativer Analyse der Ratio-Ergebnisse unter Bradykinin-Zugabe konnten diese als normalverteilt verifiziert werden (Kolmogorov-Smirnov-Test). 15 von insgesamt 91 Fälle wurden als ungültig definiert: Bei 13 Fällen lag die Differenz zwischen Basalwert und Ratio_{\max} unter 0,1 sodass diese als reaktionslose Zellen ausgeschlossen wurden. Zwei Zellen wurden im Rahmen einer Ausreißer-Analyse ausgeschlossen. Die untersuchten 76 Zellen waren jedoch ausreichend, um eine statistische Signifikanz der Bradykinin-induzierten Änderung in der intrazellulären Kalziumkonzentration nachzuweisen.

Die Maximalwerte der Ratios als Reaktionsantwort von pOB auf ATP und Bradykinin wurden statistisch aufgearbeitet, um zu erörtern ob sich ATP und Bradykinin in ihrem Effekt auf die Kalziumkonzentration unterscheiden. Dazu wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, um die Normalverteilung der Daten zu sichern. Der empirische p-Wert belief sich auf 0,200 und übertraf damit

den α -Fehler von 5 %. Die Daten unterscheiden sich darum nicht signifikant von einer Normalverteilung, weswegen anschließend ein zweiseitiger t-Test der unabhängigen Datenreihen (ATP-induzierte Ratio_{\max} ; Bradykinin-induzierte- Ratio_{\max}) durchgeführt wurde. Es liegt eine durchschnittliche Differenz der Ratio_{\max} -Werte nach Bradykinin und ATP-Aktivierung von 0,28 mit einem Standardfehler von 0,05 vor; der t-Wert ergab einen empirischen p-Wert unter 0,001. Die ATP-induzierte Ratio_{\max} unterscheidet sich demnach signifikant von der Bradykinin-induzierten Ratio_{\max} , wobei ATP in der verwendeten Konzentration einen stärkeren Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration ausübt als Bradykinin (Abb. 26).

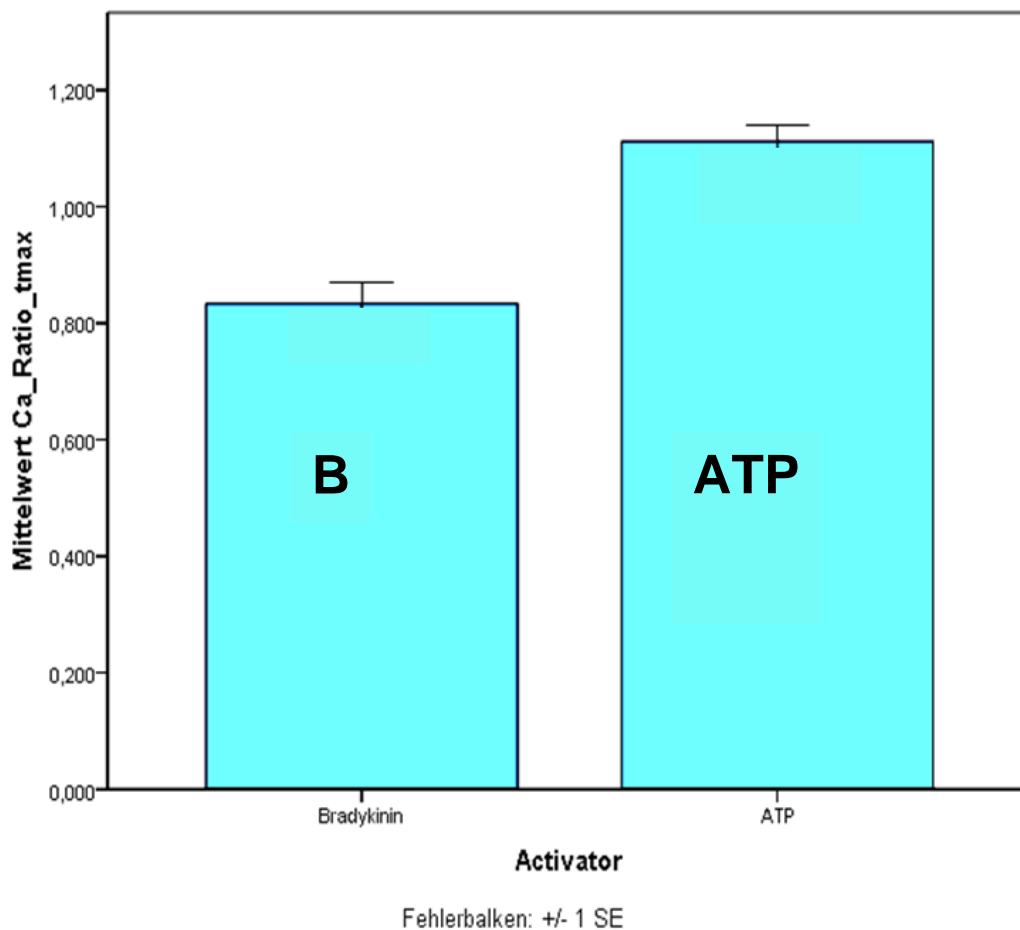


Abbildung 26: Effektvergleich von Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Behandlung mit 100 μM ATP bzw. 1 μM Bradykinin

Darstellung der signifikant unterschiedlichen maximalen Effekte von Bradykinin oder ATP in den angegebenen Konzentrationen auf den intrazellulären Kalziumspiegel mit Angabe des jeweiligen Standardfehlers.

Zur Berechnung der absoluten Werte wurden die Mittelwerte verwendet, wie in **Methoden** beschrieben, sodass auch diese als Durchschnittswerte zu betrachten sind.

	[Ca ²⁺] _i vor Aktivierung	[Ca ²⁺] _i Max nach Aktivierung
ATP	37 nM	1262 nM
Bradykinin	45 nM	335 nM

Als Kontrollversuch wurden n = 12 Zellen mit HEPES-Lösung ohne Aktivator versetzt und analysiert. Es zeigte sich keine Abweichung der F₃₄₀/F₃₈₀-Ratio von der Basislinie (Abb. 27).

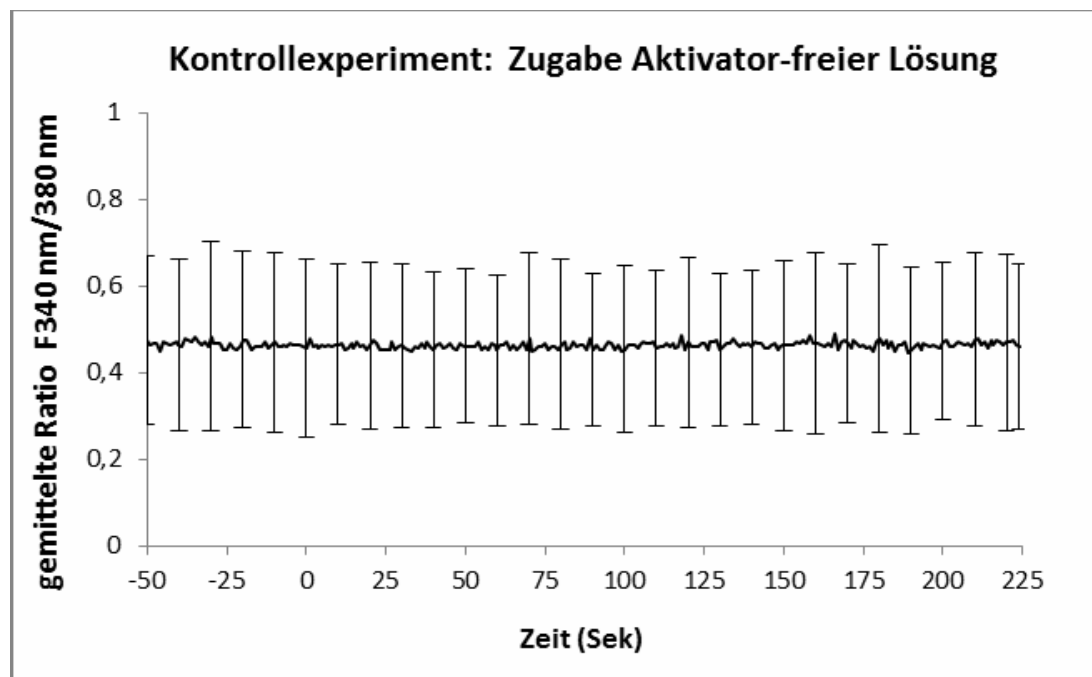


Abbildung 27: Keine Nachweis eines Kalzium-Peaks bei Kontroll-Behandlung

Fura-2AM-gefärbte primäre Osteoblasten reagierten nicht auf die Zugabe einer Aktivator-freien HEPES-Lösung (bei 0 s). Es stellte sich eine mittlere Basalratio von 0,46 ein (n = 12 Zellen).

In nicht gezeigten Test-Versuchen kam es bei Thapsigargin-Zugabe (3 μM) zu einem sofortigen Peak der Ratio, der im Verlauf von 30 Minuten wieder komplett abfiel und effektiv die intrazellulären Kalziumspeicher entleerte. Die Kontroll-Versuche wurden nach einer 30 minütigen Inkubation der Zellen mit Thapsigargin durchgeführt. Die Zellen wurden mit 100 μM ATP aktiviert und waren entweder mit Thapsigargin vorbehandelt ($n = 22$) oder nicht ($n = 33$). Der gemittelte F_{340}/F_{380} -Ratioverlauf wurde aus den gewonnenen Messwerten berechnet. Eine Thapsigargin-Vorbehandlung führte zu keiner erkennbaren Zellantwort in Form eines Ratio-Anstiegs nach ATP-Aktivierung. Das Ratio-Maximum (R_{max} Rohdaten = 0,34) bei ATP-Stimulation ohne Vorbehandlung war im Vergleich zur gemittelten Ratio der vorbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt ($R_2 = 0,30$) signifikant größer mit einem p-Wert von 0,001.

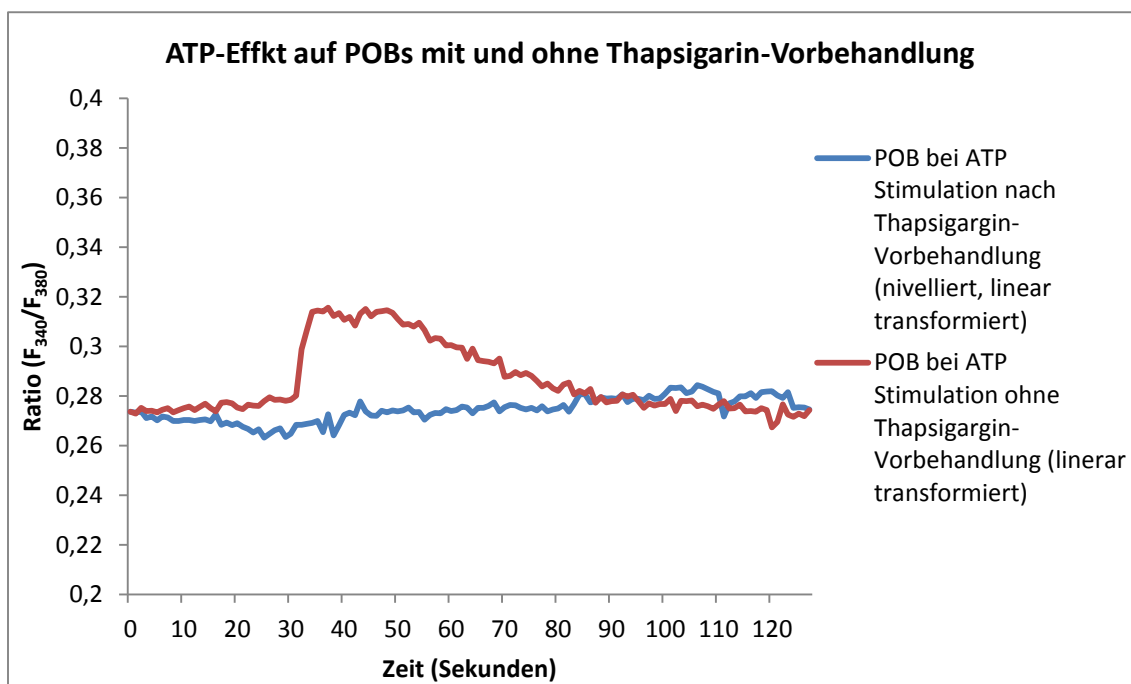


Abbildung 28: ATP-Effekt auf pOB mit und ohne 30 minütiger Vorbehandlung mit Thapsigargin

Ein Versuchsserie von $n = 22$ Zellen wurde 30 min in 5 μM Thapsigargin inkubiert, um die intrazellulären Kalzium-Speicher zu entleeren und daraufhin mit 100 μM ATP stimuliert. Der gemit-

telte blaue Graph zeigt keinen Anstieg der F_{340}/F_{380} -Ratio nach ATP-Stimulation bei den mit Thapsigargin vorbehandelten Zellen, im Gegensatz zum Kontrollversuch (rot, n = 33 Zellen) ohne vorherige Thapsigargin-Behandlung.

4 Diskussion

In kultivierten primären bovinen Osteoblasten induzierte die Stimulation mit ATP oder Bradykinin eine schnelle Paxillin-Redistribution in transienten Aggregaten. Dieser Zytoskelett-Reaktion ging ein Anstieg der Kalziumkonzentration zeitlich voraus. Außerdem konnte die schnelle Paxillin-Austauschrate an reifen FA aus dem Proteinpool nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass diese Veränderungen in den Osteoblasten zu der Anpassungsfähigkeit beitragen, damit im Knochengewebe eine anforderungsgemäße Strukturadaptation auf Umgebungsreize ermöglicht wird.

Zunächst wurden die Zugkräfte von eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB durch Traction-Force-Messungen bestimmt, um die Kraftentwicklung bei Adhäsion und den Kräfteverlauf während der Ablösung zu quantifizieren. Dabei deutete die räumliche Übereinstimmung starker Zugkräfte und hoher FA-Dichte auf einen funktionellen Zusammenhang von Traction-Force (TF) und struktureller Adhärenz hin. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Fachliteratur, die größtenteils einen linearen Zusammenhang von TF und fokalen Kontakten bei stationären Zellen anerkennt [10]. Bershadsky et al. korrelierten Kraftstärke und FA-Assemblierung auf der Basis einer vermuteten FA-vermittelten Mechanosensitivität [15]. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurden Regionen hoher FA-Dichte ohne Zugkraftkorrelat registriert, was auf unterschiedlichen FA-Stadien zurückgeführt wird. Es muss jedoch beachtet werden, dass andersorts die individuelle Zugkraft an FA und hier die Zellzugkraft gemessen wurde.

Die Korrelation zwischen FA-Größe und der assoziierten Zugkraft wird kontrovers diskutiert: naszierende FA üben variable, z.T. sehr starke, propulsive Kräfte aus [12]. Mittels Fourier-Transform-Traction-Cytometry (FTTC) und TRPF-Technologie (Traction reconstruction with point forces) wurde eine enge Beziehung zwischen FA-Größe und Kraftentwicklung lediglich in entstehenden FA nachgewiesen, während spätere Reifezustände von der Zugkraft größenunabhängig waren. Dabei werden den FA unterschiedliche Funktionen von einer

simplen Anker-Rolle bis zur Transmission hoher Adhärenz-Kräfte um 200 nN zugeschrieben [197]. Die in der vorliegenden Arbeit erstellten Fluoreszenzbilder und Vektorengraphiken bestätigen frühere Beobachtungen, dass Adhärenz-Kräfte an distalen Zellregionen lokalisiert sind [205]. Sie entsprechen ferner dem Tensegrity-Modell, da die Trypsin-induzierte Ablösung primär einseitig scheint und eine Zellkontraktion zum noch adhärenen Zellteil folgt. Dieses Modell der spannungsbedingten, sukzessiven Ablösung könnte auch den sprunghaften Kräfteanstieg erklären (Abb. 5). Zugkraft soll einzelne FA durch strukturelle Proteinveränderung stabilisieren und ein FA-Turnover verhindern, sodass die Zelle sich stärker verankert [79]. Bei externer Kraftapplikation wurde eine verstärkte Rekrutierung von Vinculin und Paxillin im Sinne einer FA-Reifung und gesteigerter Adhärenz registriert [160], was den hier beobachteten Kraftanstieg bis zur kompletten Ablösung der Zelle von ihrer Substratunterlage erklären könnte. Kraft-induzierte Adhäsion dient womöglich dem kurzfristigen Versuch der Zelle sich der Ablösung zu widersetzen.

Im Kontext der hier geschilderten, eigenen Versuche ist zu bedenken, dass Nukleotid-Stimulation über CamK2- [60] oder Rho A-Aktivierung [116] zu verstärkter Aktin-Myosin-Kontraktilität [171] und so zu vermehrtem Stress an FA führt. Das hier beobachtete Auftreten von neugebildeten Paxillin-Clustern bei Nukleotid-Stimulation könnte auf grundlegende Änderungen der Zytoskelett-Architektur hinweisen, durch die nicht nur regionale Zellmotilität, sondern auch zelluläre Adhärenz gewährleistet und lokal reguliert werden kann.

Die zelluläre Kontraktilität ist wohl maßgeblich an der FA-Regulation beteiligt, aber auch externe Kräfte und die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung beeinflussen die FA-Assemblierung von fokalen Adhäsionen. Externe Kräfte bewirken die Ausrichtung von Stressfasern (stress fiber) entlang der Kraftachse sowie möglicherweise eine Paxillin-Akkumulation in der mechanosensitiven Zellperipherie [214]. Neben der Kontraktionsvermittlung wurde anderorts die Gerüstfunktion von Stressfasern für die FA-Bildung betont [155]. Gardel et al. identifizierten die Assemblierungsgeschwindigkeit von F-Aktin als neues Regulationsmodul mit inverser Korrelation von Assemblierungsgeschwindigkeit und

TF in frühen FA-Stadien [79]. An reiferen FA hingegen wurde bei niedrigem TF auch niedrige F-Aktin-Geschwindigkeiten, also ein direkter Zusammenhang registriert.

Die basale TF-Technik wird neuerdings mit Fluorescent-Speckle-Mikroskopie kombiniert; komplexe Bildbearbeitung erlaubt Bildüberlagerung, 3D-Darstellung und Heat-Scale-Plots [130]. Die Spinning-Disc-Methode wurde zur Störfaktor-Kontrolle durch Mikromusterung (Micropattern) des Substrats erweitert [78], so dass FA-Adhäsionsstärke mit der Dichte der FA-Proteine korreliert werden konnte. Dabei wurde überwiegend Integrin-Clusterung für die zelluläre Adhäsionsstärke verantwortlich gemacht, wobei die Relevanz von FAK und anderen Strukturproteinen ebenfalls verdeutlicht wurde [59]. Der etablierte Einsatz des Rasterkraftmikroskops (AFM) ist eine weitere Methode zur hochauflösenden Betrachtung (< 1 nm) der Adhäsionskräfte mittels Kraft-Abstandskurven. Außerdem ist die Echtzeitbeobachtung der mechanischen Zellmorphologie in Reaktion auf externe Stimuli möglich, sodass z.B. eine quantitative Analyse der lokalen Kräfteverhältnisse bei ATP-Aktivierung denkbar wäre. Durch Überlagerungs-Analyse von AFM und Fluoreszenzmikroskopie wurde die Paxillin-Lokalisation innerhalb FA bereits als membranproximal charakterisiert [72].

Dem intrazellulärem Kalziumspiegel wird in dieser Arbeit ausreichend Beachtung geschenkt, ist jedoch auch im Kontext der zeitlichen Zugkraftentwicklung interessant. Doyle et al. [56] untersuchten den dehnungsinduzierten Kalziumanstieg und CTF in einem modifizierten Gelatin-Assay durch simultane Betrachtung. Der Kalziumanstieg und die Zugkraft verhielten sich chronologisch und proportional mit einem Zugkraftanstieg maximal 30 s nach dem Kalzium-Gipfel, was eine kausale Beziehung nahe legt. In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Zusammenhang von Kalziumanstieg und der dynamischen Entstehung von membranständigen Paxillin-Clustern innerhalb von 100 s registriert (Abb. 10), was die Kalzium-abhängige Aktin-Myosin-Kontraktilität [170] mit der ATP-Stimulation und der Zytoskelett-Reorganisation in Beziehung setzt. Ay et al. setzten zur Messung der Adhäsionskräfte effektiv Dielektrophorese ein und korrelierten Zugkräfte positiv

mit FAK-Aktivierung [6]. Die verschiedenen Methoden zur Erforschung der Mechanosensibilität wurden von Sen und Kumar ausgiebig dargestellt [187].

Was die TF-Quantifizierung betrifft, konnten bei den hier betrachteten stationären Zellen mit Werten von 30 bis 240 N/m² vergleichbare Zugkräfte gemessen werden wie bei anderen methodengleichen Arbeiten, die Kräfte von 15–200 N/m² [15, 218] bzw. 2,5 µN/Zelle [200] registrierten. Die mittlere Adhärenzkraft betrug bei weiter Streuung 701 dyn/cm² (~ 70,1 N/m²). Unter Trypsinzugabe konnte eine Kraftsteigerung zwischen verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden, was die Annahme eines Adhärenzanstiegs reaktiv zur drohenden Zellablösung unterstreicht [30].

Hier wurde zum ersten Mal in pOB die zeitliche Entwicklung der intrazellulären Zugkräfte bei Trypsin-induzierter Ablösung dargestellt. Auch Sen und Kumar untersuchten die Ablösungsdynamik einzelner Zellen unter Trypsin, setzten aber als abhängige Variable nicht Kraftstärke, sondern die normalisierte Flächenveränderung der Zelle (normalized area) ein [186]; dabei stellte sich die Flächenreduktion als sigmoidale Funktion der Zeit da, die durch zwei Zeitkonstanten definiert war. Es wurde eine schnellere Ablösung (150 s) als in dieser Arbeit beobachtet (bis zu 300 s), was bei unterschiedlichem Zelltyp und situativer Zellsteifigkeit sowie unterschiedlichen Substratoberflächen akzeptabel erscheint. Analog zu der beobachteten Zunahme der Flächenverkleinerung konnte hier eine allmähliche Kraftzunahme beobachtet werden. Diese Beobachtungen gehen mit der bekannten Hypothese einher, dass es sich auch bei proteolytisch getriggelter Ablösung nicht um ein passives Geschehen [229] handelt, sondern um einen aktiven Prozess. Dies wird durch die längere Dauer bis zur Abrundung bei Zugabe des Myosininhibitor Blebbistatin untermauert [186].

Partielle Zellablösung findet auch im Migrationsprozess statt, der eine Ablösung des hinteren Zellteils, Propulsionskräfte und eine stabile Adhäsion des vorderen Zellteils erfordert. Im Migrationsprozess führt ein Kalziumanstieg zur Steigerung der lokalen Zugkraft im hinteren Zellteil bis zu dessen Retraktion, was mit dem Zugkraftanstieg vor der kompletten Ablösung mit Trypsin übereinstimmt.

Der Ablösungsprozess mit Zellflächenverkleinerung lässt sich auf die Trypsin-abhängige proteolytische Sprengung fokaler Kontakte, aber eben auch auf aktiv generierte TF [186], zurückführen. Zellretraktion in migrierenden Fibroblasten wurde von Burton et al. auf einen der Ablösung vorangehenden TF-Impuls auf FA zurückgeführt [30]; außerdem wurde ein Kraftanstieg bei Flächenreduktion der Zelle vermerkt. Dies widerspricht jedoch der Annahme, dass Myosin-vermittelte Kontraktilität die FA-Stabilität erhöht. Übersteigt die Zugkraft die FA-Adhärenz-Möglichkeiten kommt es wahrscheinlich zur Ablösung. Sen und Kumar [186] begründeten die frühe Ablösungsphase mit der direkten Abhängigkeit der Ablösung von der Trypsin-Konzentration. Stressfasern und der F-Aktindichte in direkter FA-Umgebung wurden eine fördernde Gerüstfunktion bei der FA-Reifung zugesprochen [197]. Zusätzlich wurde eine Entkopplung der Zellkontraktilität von der Präsenz von Stressfasern vermutet, die eine aktive TF-Generierung auch bei Degradierung von Stressfasern gestattet und die Idee der aktiven Dynamik der Zellablösung untermauert. Interessanterweise führt Trypsin zu einer Aktivitätssteigerung der Tyrosinkinase c-Src, die zur Destabilisierung von FA beiträgt [142]. Gesteigerte Src-Aktivität bewirkt eine Unterbrechung der FA-Reifung zugunsten des FA-Umsatzes. Umgekehrt wurde die Phosphorylierung von FA-Strukturmolekülen sowie TF-Generierung mit FA-Destabilisierung und gesteigertem Migrationsverhalten in Verbindung gebracht [222]. Bezogen auf Paxillin bewirkt extern applizierte Zugkraft eine Reduktion von dessen phosphoryliertem Anteil, wobei nicht differenziert werden konnte, ob es sich dabei um eine kraftinduzierte Dephosphorylierung oder eine Rekrutierung von nichtphosphorylierten Paxillin-Molekülen handelt.

Daten aus den hier nicht gezeigten TF-Versuchen mit MG63-Osteosarkomzellen ergaben im Einklang mit früheren Resultaten [45] deutlich niedrigere Zugkräfte als bei pOB. Kanzeröse Zelllinien scheinen abnorme Zugkräfte zu entwickeln: H-ras-transformierte 3T3-Zellen zeigten desorganisierte Protrusionen mit wechselnder Kraftverteilung, mangelnder Orientierung und chaotischer Zugrichtung, migrierten aber schneller [149].

Die Darstellung von Paxillin in transfizierten pOB gelang mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung. Die zusätzliche Kernfärbung ermöglichte dabei eine gute Differenzierung der Zellkompartimente. Ruhende pOB zeigten wenige punktförmige bis elliptische Intensitätsanreicherungen in der Zellperipherie, wobei es sich am ehesten um Paxillin-haltige, reife FA handelt. Paxillin ist ein etablierter Marker in diesen Strukturen [48]. Freies Paxillin im Proteinpool bewirkte eine diffuse Zytoplasmafärbung.

In weiteren Experimenten wurde ein Plasmid, das für ein Fusionsprotein von enhanced-GFP mit Paxillin kodierte, zur Transfektion von Osteoblasten eingesetzt. Durch Chromophor-Mutationen und Optimierung der Kodon-Nutzung im peGFP-Vektor wurde eine verbesserte Transfektionsrate gegenüber nativem Quallen-GFP, eine höhere Photostabilität und Expressionsrate bei reduzierter Toxizität in Säugetierzellen erreicht [231]. EGFP ist zur Visualisierung von FA-Proteinen gut etabliert [193], jedoch sind berichtete Aktivitätsreduktion der NF κ B- und JNK-Signalkaskaden [8], leichte pH-Sensitivität und eine Dimerisierungstendenz durch eGFP zu berücksichtigen [208]. Zimerman und Kollegen [244] gelang mit eGFP-gekoppelten Stressfasern bzw. FA-Proteinen nur die Darstellung reifer FA. Die problematische Darstellung kleinerer FA wurde auf deren Fluoreszenzmangel, störende Proteinüberexpression und Überbelichtung bei eGFP-Einsatz zurückgeführt, sodass Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) präferiert wurde. EGFP-Paxillin-haltige Aggregate wurden hier in dieser Arbeit in Echtzeitaufnahmen ohne Darstellungsprobleme oder Hinweise auf methodisch verzerrte Proteinverteilung oder -expression beobachtet, was auch andersorts gelang [123].

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie mit entsprechender Software (z.B. ImageSurfer) gewährt 3D-Aufnahmen mit detaillierter Darstellung von Räumlichkeitsbeziehungen zellulärer Strukturen [68]. Entsprechende Geräte standen für diese Arbeit jedoch nicht zur Verfügung. Live-Cell-Photoactivated-Localization-Mikroskopie (PALM) stellt durch seine hohe Auflösung und Betrachtungsmöglichkeit hochmotiler Proteine eine weitere reizvolle Visualisierungsmethode dar [75].

Die Auszählung und Messung von Fluoreszenzintensitäten der induzierten Paxillin-Aggregate, wie hier erfolgt, liefert verlässliche Aussagen zur Kinetik von Zytoskelett-Veränderungen im Verlauf einer Stimulation der Zellen. Die Größe der einzelnen FA sollte jedoch softwarebasiert objektiviert werden, um die *de novo* entstandenen Paxillin-Aggregate quantitativ von kleineren reifen FA zu differenzieren. Latrunkulin-A-Zugabe/Entzug schaffte bei migrierenden REF52-Zellen eine Verbesserung der hochauflösenden Mikroskopie von naszierenden FA [244]. Da Paxillin zu den ersten erkennbaren Proteinen in ähnlichen Strukturen zählt, erscheint eine solche Vorbehandlung in Nachfolgeversuchen sinnvoll.

Die betrachteten Zellen lagen in einem ruhenden, adhärenen Zustand vor. In den hergestellten immunzytochemischen Präparaten waren größere Punkte mit lokal hoher Fluoreszenzintensität an Zellausläufern zu erkennen, bei denen es sich am ehesten um reife fokale Adhäsionskontakte (mature focal contacts) handelt [16] und nicht um deren Vorläuferstrukturen [58]. Demgegenüber sind die Paxillin-Cluster in den ATP- oder Bradykinin-stimulierten Osteoblasten abzugrenzen, die sich in den Echtzeitaufnahmen als dynamische Strukturen darstellen ließen. Letztere sind über die Zelle verteilt und können im Verlauf auch wieder untergehen, sind also zeitlich transient und weniger stabil als vorbestehende FA. Zur weiteren Unterscheidung wäre die Testung des assoziierten Integrintyps und zusätzlicher Paxillin-Bindungspartner nötig, z.B. mit einer Ko-Färbung bzw. Ko-Transfektion von Vinculin und/oder $\alpha_5\beta_3$ -Integrin. Nachweise von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin oder Tensin würden auf fibrilläre Adhäsionen hindeuten. Diese wären jedoch eher im Zellzentrum lokalisiert und sind besonders bei weichen Substraten zu finden [242]. Die Assoziation Paxillin-haltiger FA mit filamentären Strukturen (Abb. 7/9) deutet auf Stressfaser-Kopplung hin. Stressfasern terminieren bekanntlich in FA, wirken FA-stabilisierend und ermöglichen Krafttransmission. Diese Kopplung könnte durch eine simultane Aktinfärbung z.B. mit fluoreszierendem Phalloidin [39] bestätigt werden.

Die variable Größe einzelner Paxillin-haltiger Komplexe wirft die Frage nach deren Einteilung auf: Könnte es sich dabei sogar um Podosomen handeln, die bis

dato in Osteoklasten, monozytischen und malignen Zelllinien gefunden wurden? Podosomen sind dynamische ($t_{1/2} = 2 - 12$ min) ringförmige, 0,5 - 1 μm große Adhäsionen aus einem Aktinkern, umgeben von FA-Proteinen [134]. Podosombildung wird durch Adhäsion aktiviert und ist in Muskelzellen mit PKC-Aktivität assoziiert [87], die auch im ATP-Stimulationsweg involviert ist. Mit einer simultanen Aktin/Paxillin-Färbung könnten eGFP-Paxillin-umlagerte Aktinkerne beobachtet werden, was auf Podosome hinweisen würde. Mikroarchitektur-Untersuchungen fokaler Komplexe, die Paxillin in der Peripherie einzelner Komplexe um einen zentralen, aktinreichen Kern lokalisieren, könnten zumindest darauf hin deuten [244].

Die strukturelle Vielfalt der Paxillin-enhaltenen Membranstrukturen ist möglicherweise multikausal begründet: Zum einen sorgt die differentielle Proteinausstattung für spezifische sekundäre Kaskaden, sodass die Beschaffenheit der Zellumgebung oder externe Signale transmittiert und in spezifische biochemische Informationen übersetzt werden können. Des Weiteren bietet die dynamische Zusammensetzung erst die Möglichkeit zur Reifung und damit zu variablen Adhärenz-Kräften und schneller Adaptationsfähigkeit des Zytoskeletts. Diese Vielfalt machen sich Tumorzellen zunutze, die durch veränderte Integrin-Strukturen in verschiedenen Geweben bewegungsfähig sind [96]. Auch Paxillin-Überexpression oder Mutationen wurden bei Tumorzellen festgestellt, was Karzinogenese mit Veränderungen des Adhesomes in Verbindung bringt [213].

Verdichtetes Tumorstoma soll durch die höhere externe Krafteinwirkung mitogen wirken, indem es verstärkte intrazelluläre Zugkräfte und Signalkaskaden vermittelt [14]. Zell-Matrix-Adhäsionen mit Signalcharakter existieren also nicht nur in zweidimensionalen Zellkulturen, sondern auch in 3D-Verbänden [173]. Die Zytoskelett-Architektur stellt sich jedoch im 2D-Substrat (wie in der vorliegenden Arbeit) anders dar als in 3D-Matrizen, die eine *in vivo* Situation besser simulieren: In 2D-Systemen zeigten Fibroblasten eine Ventral-Verteilung der FA, induziert durch Spannungsunterschiede zwischen der Zellauffläche bzw. dem Substrat, was im Gewebezusammenschluss nicht vorkommt. Eine strukturelle

Assoziation bekannter FA-Proteine konnten Fraley et al. [71] im 3D-System nicht darstellen, doch aber deren Zytoplasmapräsenz und den Einfluss auf die Zellmotilität über die Regulation von Membranprotrusionen. Die Persistenz und Größe von derartigen Substratkontakten scheinen in ähnlichen Experimentalansätzen deutlich geringer und ggf. vernachlässigbar zu sein, wobei jedoch eine Depletion diverser FA-Proteine die Zellmotilität deutlich beeinflusst und die Adhärenz herabsetzte [45]. Dies legt, trotz verschlechterter Visualisierbarkeit im dreidimensionalen System, eine zentrale Bedeutung dieser Proteinkomplexe für Zellmotilität nahe, wobei die Existenz von tatsächlichen FA *in vivo* noch diskutiert wird [99]. Geraldo et al. gelang es, fokale Adhärenz-Konglomerate intravital in Krebszellen nachzuweisen, wobei eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse in zweidimensionalen Adhärenz-Systeme limitiert bleibt [82].

Auch die häufig beschriebene Assoziation von Zugkraft in Regionen hoher FA-Dichte von *in vitro* Ansätzen scheint *in vivo* zurzeit nicht belegbar. Obwohl das Zellkulturmodell Jahrzehnte als experimenteller Standard das zelluläre Verständnis geprägt hat, scheint es die Realität eines Gewebeverbandes in seiner Komplexität nicht Genüge zu tragen. Mit neuen Methoden des modernen Bioengineering muss die Rolle und Lokalisation fokaler Adhäsionsproteine weiterhin unvorbelastet genauer intravital untersucht werden, um bisheriger Modelle zu validieren oder anzupassen.

Die Wahl von ATP in dieser Arbeit als Aktivator ist zum einen durch seine Bedeutung im Knochenstoffwechsel besonders bei zellulärem Stress zu erklären, zum anderen durch seine Affinität zu den gut untersuchten P2-Rezeptoren. Außerdem wurde das Fehlen von ATP in der Auflistungen bereits untersuchter Stimuli in ähnlichem Kontext [25, 180] bemerkt, sodass es als eine sinnvolle Wahl erschien.

Abhängig vom Differenzierungsgrad [153] stimuliert ATP in Osteoblasten [77] und Osteoklasten [235] über G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren einen Kal-

ziumanstieg aus dem endoplasmatischen Retikulum. Über ionotrope P2X-Rezeptoren entsteht der intrazelluläre Kalziumanstieg über extrazellulären Einstrom [77]. Der morphologische und zeitnahe Effekt von ATP auf das Zytoskelett in pOB ist jedoch im Detail noch unklar. Diese Arbeit verzeichnet eine qualitativ eindeutige und statistisch signifikante Neubildung Paxillin-haltiger Cluster als Reaktion auf ATP und verknüpft somit erstmals purinerge Signaleffekte mit dem Verhalten einzelner FA-Strukturproteine.

Die qualitative Analyse von Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie sowie Echtzeitaufnahmeserien und TIRF zeigen, dass ATP-Stimulation eine bemerkenswerte Redistribution von Paxillin in neu entstehenden, transienten Membranstrukturen bewirkt. In allen Darstellungsmodi kam es zur Zunahme punktförmiger, Paxillin-haltiger Strukturen v.a. in der Zellperipherie, sodass ATP über Purinozeptoren und sekundäre Signalkaskaden eine Reorganisation des Zytoskeletts zu bewirken scheint. TIRF wurde als verlässliche Darstellungsmodus naszierender FA empfohlen [159] und darum zu deren genauen Lokalisierung eingesetzt. Diese Methodik erlaubt eine Fluoreszenz-basierte dynamische Darstellung mit vergleichsweise geringen belichtungsinduzierten Zellschäden [36]. Obwohl die Epifluoreszenz-Zunahme die Redistribution von eGFP-Paxillin in neue FA bei ATP-Aktivierung bestätigte, konnte keine häufige Ko-Lokalisierung von TIRF-Signalen mit der Epifluoreszenz erfasst werden. Eine Ko-Lokalisierung wäre im TIRF-Kontext so zu interpretieren, dass die beobachteten Strukturen in optischer Reichweite von 110 nm lokalisiert sind, gemessen ab dem Deckglas-Zell-Übergang. Das vorliegende Ergebnis lässt vermuten, dass die ATP-induzierten Strukturen nicht (nur) spezifisch an Stellen mit starkem Zell-Matrix-Kontakt (ventralen Zellfläche), sondern auch an der dorsalen Zelloberfläche und ubiquitär lokalisiert sind. Zur Verifizierung dieses Resultats sollten die Ergebnisse repliziert und konfokale Mikroskopie zur Aufklärung der räumlichen FA-Position eingesetzt werden. Anderorts konnte TIRF meist die ventrale Lokalisation naszierender FA nachweisen.

Die mit Fluoreszenzmikroskopie aufgenommene Echtzeitdarstellung der pOB-

Reaktion auf ATP ermöglichte eine zeitliche und semiquantitative Aussage über die Entwicklung dieser transienten Paxillin-Cluster. In den ersten 50 s nach ATP-Zugabe zeigte sich keine Veränderung der diffusen Paxillin-Verteilung. Nach 100 s traten *de novo* Formationen Paxillin-anreichernder Strukturen am Zellrand und gelegentlich neue Protrusionen auf. Ohne konfokale Mikroskopie sollte jedoch keine Interpretation dieser vermuteten Protrusionen erfolgen. Bis zu 600 Sekunden nach der Aktivierung kam es zu einer stetigen Zunahme, danach zu einer Abnahme der Anzahl und individuellen Größe dieser Strukturen. Die zeitabhängige Zunahme nach der Stimulation war statistisch relevant ($p < 0,001$) und konnte auf die ATP-Behandlung zurückgeführt werden.

Die Tatsache, dass der induzierte Effekt im Beobachtungsverlauf nicht weiter fortschritt, sondern rückläufig war, kann mehrere Gründe haben. Extrazelluläre, membrangebundene Ekto-Nukleotidasen (NPP 1/2) bewirken den Abbau von ATP zu Adenosin-Diphosphat (ADP) und Adenosin (A), die zwar auch über P2 bzw. A1/2- Rezeptoren ATP-ähnliche Effekte bewirken, die aber weniger stark sind. Die Rückläufigkeit des ATP-Effekts wäre also durch dessen kurze Halbwertszeit erklärbar [89]. NPP-Dysfunktion ist mit Knochen-mineralisierungsstörung und Krebsinvasivität assoziiert. Andererseits trägt ATP-Stimulation über die Aktivierung von GPCR-stimulierten Kinasen durch intrazelluläre Phosphorylierung zu Purinozeptor-Deaktivierung bei. Diese Rezeptor-Desensibilisierung könnte auch als negative Rückkopplung auf einer Arrestin-abhängigen Rezeptor-Internalisierung beruhen, die über ATP vermittelt wird [62]. Somit könnte der nachlassende ATP-Effekt auch über rückläufige Rezeptorverfügbarkeit erklärt werden. Qi und Mitarbeiter interpretieren die ATP-vermittelte Desensibilisierung des eigenen Rezeptors als zentrale Gewebefunktion, da desensibilisierte Zellen für weitere ATP-Stimuli unempfindlich werden und somit der ATP-abhängigen Wirkung von exzessiver mechanischer Belastung und pathologischen Umgebungssignalen entgehen [167]. ATP führt über MAPK-abhängige NF κ B- Aktivierung zu einer reduzierten Zellvorspannung (prestress), was deren Mechanosensibilität herabsetzt und die Zelle schützt.

Die Halbwertszeit eines individuellen Paxillin-Clusters war mit < 4 Minuten viel kürzer als der globale Zeitraum, in dem solche Strukturen als transiente Gebilde beobachtet werden konnten. Einzelne beobachtete Cluster entstanden und verschwanden rasch bei einer insgesamt progredienten Zunahme im Aktivierungsverlauf.

Die Assemblierungszeit eines individuellen Aggregats war mit 49 ± 9 Sekunden statistisch signifikant ($p = 0,029$) kürzer, nämlich halb so lang, wie die folgende Auflösungsphase mit 101 ± 28 Sekunden. Choi et al. registrierten mittels TIRF eine Lebensspanne aufkeimender Komplexe in Paxillin-exprimierenden, migrierenden Cho.K1-Zellen von $76,1 \pm 22,0$ s [35], was mit vorliegenden Werten vereinbar ist. Definitionsgemäß machen naszierende Komplexe innerhalb 60 s einen Turnover durch [159], was mit den vorliegenden Daten insofern übereinstimmt, dass Paxillin-enhaltende Protrusionen in dieser Zeitspanne (nach Aktivierung) entstehen, sich dann aber strukturell verdichten oder jenseits der 60 Sekunden-Marke disassemblieren. Durch deren insgesamt steigende Anzahl bei Stimulation lässt sich ableiten, dass die *de novo* Formierung dem Turnover einerseits überwog und die entstandenen Cluster andererseits in reifere Strukturen maturierten. Es wäre interessant zu untersuchen, ob für diesen Prozess hier eine ATP-induzierte Paxillin-Phosphorylierung, etwa an den Resten Tyr31 und Tyr118, von Bedeutung sein könnte [36].

Neben der eGFP-Paxillinfluoreszenz der FA, die mit Paxillins lokaler Konzentration korreliert, lag eine basale Zytoplasmafärbung vor, was auf ungebundenes Paxillin hindeutet. Wolfenson und Mitarbeiter charakterisierten vier Zustandsfraktionen von FA-Proteinen: eine schnell diffundierende Fraktion aus dem zytoplasmatischen Pool, wobei sich Paxillin unabhängig von FAK bewegt und die beiden Proteine auch erst innerhalb des FA Kontakt aufnehmen [124], eine juxtamembrane Fraktion nahe FA mit abgeschwächter Diffusion, eine lokal mobile Fraktion in Austauschbewegung und eine immobile strukturelbundene Fraktion. Letztere konnte hier in den eigenen Experimenten nur mit kleinem Anteil verzeichnet werden (95 % Recovery), der bei Wolfenson et al. mit 20 % viel

stärker ausgeprägt war. In anderen Arbeiten wurde auch eher eine komplette Paxillin-Recovery beobachtet [160, 188]. Deakin et al. registrierten eine immobile Paxillin-Fraktion deutlich unter 20 %, die jedoch bei Rac1 Inhibition anstieg [50]. Diese Unterschiede werden z.T. durch die verschiedenen Zelltypen und Experimentalparameter bedingt, jedoch scheinen sowohl die Position der betrachteten FA und die Proteinkomposition in den FA selbst den Recovery-Anteil zu beeinflussen. Webb et al. zeigten, dass FA im hinteren Teil migrierender Fibroblasten unterschiedliche Wiederauffüllungszeiten aufweisen, abhängig davon, ob der vordere (Recovery > 100 %; wachsender FA-Anteil), mittlere (Recovery < 60%) oder hintere (Recovery < 50%) FA-Teil (Position in FA selbst) betrachtet wurde [221]. Die hohe beobachtete Wiederauffüllungsrate hier kann durch ständigen Paxillin-Umsatz der FA aus dem mengenmäßig größeren, zytoplasmatischen Pool erklärt werden. Die Adhärenz wird vermutlich an den reifere FA auf basalem Level in Abhängigkeit von ein- und ausgehenden Signalen ständig überprüft und die Proteinkomposition angepasst.

Die schnelle Rekrutierung von Paxillin in aufkeimenden Clustern nach über 50 Sekunden und innerhalb von 20 Minuten nach ATP-Stimulation wird von der rapiden Paxillin-Kinetik an einzelnen FA übertroffen. FRAP-Daten konnten am besten durch eine doppelt-exponentielle Kurve dargestellt werden, deren Funktion zwei verschiedene Konstanten aufwies: eine schnelle Halbwertszeit von $8,2 \pm 1,2$ s (laterale Diffusion aus dem Proteinpool) und eine weitere Zeitkomponente von 53 ± 20 s (langsamer Austausch mit der juxtamembranen Proteinfraktion [123]). Die kurze Halbwertszeit ist gut vergleichbar mit den FRAP-Ergebnissen von Lele et al. [127]: ein Paxillin-Austausch an FA mit einer etwas höheren Halbwertszeit von 17.8 ± 1.3 s bei nahezu komplettem Austausch in 2 Minuten. Wolfenson und Kollegen [224] vermerkten 11 Sekunden in den Experimenten, wobei die Paxillin-Kinetik in anderen Studien insgesamt langsamer war als in der vorliegenden Arbeit. Diese Unterschiede sind ein bekanntes Problem der FRAP-Quantifizierung, da ein Kinetik-Vergleich verschiedener Zelltypen kaum sinnvoll erscheint und $t_{1/2}$ zur Quantifizierung wenig ideal ist. Neuere Methodik-Kombinationen (z.B. FLIP-FRAP) zeigten eine Paxillin-Residenzzeit in FA von

bis zu 60 s, was einer transient immobilen Fraktion entsprechen soll [124]; dies konnte anderorts jedoch nicht reproduziert werden und lässt sich schlecht auf die Dynamik und hohe Mobilität von Paxillin übertragen. Talin wurde in seiner Dynamik an FA mit 10-minütiger Wiederauffüllungszeit als vergleichsweise langsames FA-Protein identifiziert, während FAK innerhalb weniger Sekunden komplett mobil war [127], was jedoch schlecht mit der in [124] beobachteten langen Strukturgebundenheit (120 s) von FAK vereinbar ist. Insgesamt weisen FA-Proteine deutliche Unterschiede in ihrer Dynamik und Verweildauer auf. Lele und Mitarbeiter identifizierten die Dissoziation von FA-Proteinen als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im FA-Turnover, die bessere Vergleichswerte abgeben soll als die gemessenen Recovery-Halbwertszeiten. Die FRAP-Daten von Digman et al. zu reifen FA in Hamster-Ovarialzellen zeigten einen kompletten Austausch von Paxillin innerhalb von 12 Sekunden [54], was trotz der unterschiedlichen Zelllinien und der besseren Methodenqualität ihrer Daten gut zu den hier erhobenen Ergebnissen passt. Nur in naszierenden FA wurden eine annähernd 100 %-ige Paxillinmobilität wie hier registriert, was auf die Bedeutung von Paxillin bei der initialen und transienten FA-Stabilisierung hinweist.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit gelang es Digman und Mitarbeitern durch aufwendige Methodik eine gewisse Heterogenität der Paxillin-Verteilung und Mobilität in Adhäsionen unterschiedlicher Lokalisation und Größe zu identifizieren, sodass einzelne Klassen von Adhäsionskontakten, besonders der Unterschied reifer und naszierender Aggregate, strukturell charakterisiert und die Rolle von Paxillin differenzierter beleuchtet werden konnten. In einer neueren Veröffentlichung empfiehlt die Arbeitsgruppe um Digman die Durchführung der Raster-Image-Correlation-Spektroskopie, um die methodischen Schwächen einer FRAP-Analyse zu umgehen [174]. Humphries et al. bestätigten die Heterogenität durch unterschiedlich starke Paxillin-Bindungsaffinität und Dynamik in reifen und frühen Kontakten, wobei letztere schwächere Assoziation, aber stärkere Paxillin-Dynamik aufwiesen [105]; sie verneinten aus Versuchen mit Paxillin-depletierten Zellen (siRNA-Knock-down) eine direkte Abhängigkeit der FA-Entstehung von der Rekrutierung von Paxillin und schrieben diese Rolle Vinculin

zu [105]. Die Paxillin-Dynamik, die sie zwar in FA differenziert anerkannten, führten die Autoren auf einer indirekten strukturellen Bindung an Vinculin zurück, obwohl bis *dato* eine direkte Bindestelle postuliert wurde [210]. Andere Arbeiten gehen von einer zentraleren Rolle von Paxillin in der FA-Induktion aus, wobei besonders die differenzierte Paxillin-Phosphorylierung die Assemblierung sowie den Turnover von FA antreiben soll. Wolfenson et al. bestätigten den direkten Einfluss der intrazellulären Kraftwirkungen auf die Zusammensetzung und Dynamik von FA [225], wobei eine differenzielle Reaktion unterschiedlicher Proteine trotz deren struktureller Assoziation auf verminderte Spannung registriert wurde. Eine unter anderem durch Blebbistatin induzierte Spannungsreduktion bewirkte eine vermehrte Dissoziation von Vinculin und eine Verlangsamung der Dissoziation von Paxillin aus der Strukturgebundenheit in FA [226], was die Ergebnisse von Zaidel-Bar et al. zur erhöhten Paxillin-Phosphorylierung bei Spannungsreduktion unterstützt [238].

Der Phosphorylierungsstatus der FA-Proteine soll im Anschluss betrachtet werden, da dieser größtenteils mit der FA-Assemblierung und durch FAK-Rekrutierung mit beschleunigtem Turnover korreliert ist. Der Phospho-Paxillin/Paxillin-Quotient in FA ist hier wohl richtungswegweisend. Der spannungsbedingter Anstieg von nichtphosphoryliertem Paxillin in FA bedingt nach Zaidel-Bar et al. die Maturierung fokaler Komplexe zu reifen FA [239]. Andererseits soll Serin-Phosphorylierung von Paxillin im LIM-Bereich dessen FA-Targeting und somit FA-Assemblierung bewirken, was zeigt, dass Paxillin hochgradig und differenziert reguliert ist, sodass Zaidel-Bar et al. Paxillin treffend als zweischneidiges Schwert bezeichnen [240]. Vermehrte Tyrosin 118-Phosphorylierung wurde bei der Adhäsion an Fibronectin beobachtet, während bei GPCR-Stimulation die Tyrosin 31-Phosphorylierung überwog. Beide Phosphorylierungen zeigten jedoch eine ähnliche Steigerung der FA-Dynamik [181]. Tyrosin-Phosphorylierung steigert also das Turnover, während spezielle Serin-Phosphorylierung die FA zu stabilisieren scheint, aber auch Paxillin-Targeting an FA bedingt. In mehreren nichtmalignen Zelllinien wurde eine fehlende Serin 178-Phos-

phorylierung mit reduzierter Migration assoziiert [104, 118, 145]. Serin-Phosphorylierung soll Paxillin-Ubiquitinierung und damit FA-Turnover induzieren [2]. Die komplexe Bedeutung der Paxillin-Phosphorylierung wird noch deutlicher bei Betrachtung des E4orf4-Proteins, das tumorzellspezifische und selektive Tötungsmechanismen unabhängig von den klassischen Apoptosewegen aktivieren kann. Die damit assoziierte Phosphorylierung von Paxillin an Serin 178 durch JNK-1, aktiviert durch eine E4orf4-modulierte Src-Rho-ROCK-Achse, führt zur FA-Stabilisierung, Paxillin-Rekrutierung und dessen verlängerte Verweildauer an FA, was eine Zytoskelett-Dysregulation mit Membran-Blebbing und Apoptose bei gesteigerten intrazellulären Spannungsverhältnissen bedingt [191]. Die Effektivität der in dieser Arbeit benutzten Aktivatoren wurde in Versuchskontrollen durch die Zugabe einer Liganden-freien Kontroll-Lösung anstelle einer aktiven Substanz bestätigt: Es war keine Zellreaktion zu erkennen. Dies legt einen kausalen Zusammenhang zwischen der ATP-Stimulation und der Induktion der Paxillin-Cluster nahe. Das zweite Kontrollexperiment in STAT1-eGFP-exprimierenden Zellen bestätigte die maßgebliche Beteiligung von Paxillin an der ATP-induzierten Neuformation dieser Cluster, da in diesen Fall keine neuformierten Paxillin-Cluster erschienen. Was den methodischen Einsatz von ATP betrifft, sollte die hohe ATP-Konzentration deutliche Zellreaktionen bewirken. Ein zytotoxischer Effekt von hohen ATP-Mengen wurde vor allem für Osteoklasten nachgewiesen [147], ohne stark zytotoxisch auf Osteoblasten zu wirken. Vergleichbare ATP-Konzentrationen bewirkten in Kornea-Zellen gute Reaktionserfolge ohne Zelluntergang [20]. Die pOB zeigten hier weder in Testversuchen mit aufsteigender ATP-Konzentration noch später Anzeichen für Zelltod oder Apoptose-ähnliches Membran-Blebbing, wie es bei Morelli der Fall war [146]. Der Gebrauch der relativ hohen ATP-Konzentration ist demnach als effektiv zu interpretieren. Alternativ könnte auch eine Aktivierung mit anderen Nukleotiden, z.B. ADP [102] oder Uridintriphosphat (UTP) [194] vorgenommen werden, da UTP mit gleichem Zelleffekt wie ATP nicht über P2X-R wirkt und ADP besonders P2Y1-R aktiviert [115]. Im Weiteren soll diskutiert werden, in wie fern die ATP-induzierten Cluster als Blebs zu bezeichnen sind [33], da auch diese (ungebundenes) Paxillin aufweisen. Panupinthu et al. registrierten ein nicht-apoptotisches

Membran-Blebbing über P2X7- Aktivierung [131, 158]. Der vergleichbare Kontext wirft die Frage auf, ob es sich bei den hier beobachteten Punkten um solche Blebs handelt. In den Versuchen von Panupinthu et al. bewirkte eine P2X7-Stimulation die Produktion und Freisetzung von Lysophosphatidsäure (LPA), das seinerseits GPCR-induzierte Kaskaden mit ROCK-Aktivierung stimulierte, sodass nicht ATP, sondern ggf. LPA für die beobachtete Zellmorphologie verantwortlich ist. In thematisch anders gewichteten Untersuchungen wurde ATP zur Zellstimulation eingesetzt, ohne dass es zur Ausbildung solcher Blebs kam, obwohl auch dort Kalziumansteige und Phosphorylierungskaskaden registriert wurden [137]. Blebs sind durch ihre Größe, deutliche Membranausstülpung und geringe Anzahl (max. 8/Zelle) charakterisiert [34]. Diese Blebs stellen strukturelle, zytoplasmagefüllte Plasmamembran-Protrusionen dar, die freie FA-Proteine enthalten können, was im deutlichen Gegensatz zu den hochorganisierten FA mit Anbindung zum organisierten Zytoskelett steht. Zu beachten ist ferner die nötige ATP-Konzentration von 5 mM zur Blebbing-Induktion und die niedrige ATP-Affinität von Blebbing-vermittelnden P2X₇-R mit einer EC₅₀ von ca. 500 µM [215]. Die in dieser Arbeit verwendete verhältnismäßig geringe ATP-Konzentration von 100 µM schließt das Ansprechen des P2X₇-R mit konsekutivem Blebbing nicht aus. Allerdings sprechen die fehlenden TIRF-Signale gegen das Vorliegen matrixgebundener FA-Strukturen, sondern für ventral oder apikal lokalisierte Membran-Protrusionen, die morphologische Ähnlichkeiten mit Lamellipoden aufweisen. Zur genauen morphologischen Differenzierung dieser Membranstrukturen ist die Durchführung einer konfokalen Mikroskopie angeraten.

Die oben beschriebenen Effekte von ATP auf transfizierte pOB weckten das Interesse an nicht-nukleotiderge Mediatoren mit Bedeutung im Knochenstoffwechsel, wie dem Nonapeptid Bradykinin. Dessen Effekte und Signalkaskaden sind zwar allgemein gut untersucht [126], jedoch noch nicht im Zusammenhang mit der Paxillin-assoziierten Zytoskelett-Reorganisation betrachtet worden. Ähnlich wie bei ATP kam es unter Bradykinin-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme Membran-assoziiierter Paxillin-Cluster in pOB. In fast allen Bradykinin-aktivierten Zellen kam es nach über 50 s zu einer stetigen Zunahme von Paxillin-

enthaltenden Aggregaten im Verlauf von 500 s, die dann sistierte. Coutant et al. beschrieben, dass Bradykinin-Stimulation in Keratinozyten eine transiente Paxillin-Phosphorylierung innerhalb einer Minute für 30 Minuten bewirkte [43]. Dieser Verlauf passt gut zu den hier induzierten Änderungen in der subzellulären Paxillin-Verteilung, was auf einen phosphorylierten Zustand von Paxillin in den beobachteten Membran-strukturen hindeuten könnte.

Proinflammatorisch wirkende Kinine induzieren Knochenresorption durch osteoblastenabhängige Osteoklastenaktivierung. Bei B2-Aktivierung entsteht ein Inositoltrisphosphat(IP₃)-getriggert Kalziumanstieg aus Thapsigargin-sensitiven Speichern [219], der auch aus dem extrazellulären Milieu gespeichert wird, gefolgt von einer PKC-Aktivierung [126]. Es kommt bei Kinin-Stimulation ferner zur RANKL-Aktivierung in Osteoblasten. In MG63-Zellen wird die Kininrezeptor-Expression durch IL-1 β und TNF- α verstärkt, was auf einen Kinin-Zytokin-Synergismus hindeutet [23]. In 3T3-Fibroblasten stellte sich Paxillin als Bradykinin-sensitives Phosphorylierungsziel dar [126]. Deshalb sollte der Phosphorylierungsgrad von Paxillin bei Bradykinin-Stimulation z.B. mittels phosphorylierungsspezifischen Antikörpern untersucht werden.

Der Kalziumspiegel von stimulierten pOB wurde gemessen, um den zeitlichen Zusammenhang mit den beobachteten Zytoskelett-Veränderungen nach Zugabe von extrazellulären Liganden zu erfassen. Sowohl ATP- als auch Bradykinin-Stimulation induzierte einen signifikanten ($p < 0,001$) intrazellulären Kalziumanstieg in den kultivierten Osteoblasten, wobei ATP in den gewählten Konzentrationen einen signifikant stärkeren Einfluss ausübte. Die unterschiedliche Rezeptordichte von pOB mit P2- und B-Rezeptoren sowie unterschiedliche und schwer vergleichbare Konzentrationseffekte der Aktivatoren erklären diesen Unterschied.

Die Konzentration von ionisiertem Kalzium im Zytosol einer ruhenden Zelle beträgt ungefähr 100 nM. Intrazelluläre Speicher enthalten 1 - 2 mM, sodass bei adäquater Aktivierung ein 10 - 100-facher Kalziumanstieg im Zytosol durch Speicherentleerung möglich ist. In dieser Arbeit kam es bei Bradykinin-Aktivierung zu einem durchschnittlichen Kalziumanstieg von 290 nM, was eine über 7-

fache Steigerung bedeutet. Der ATP-Effekt war noch ausgeprägter mit einem 35-fachen Anstieg verglichen mit dem Basalwert. Bei ATP-Stimulation kam es nach 17 s zum Kalzium-Gipfel, der in den folgenden 150 s wieder stetig abnahm. Bradykinin-Aktivierung induzierte eine vergleichbare Veränderung mit einem Maximalwert nach 18 s und folgender Abnahme über 200 s mit Rückgang auf den Basalwert. Sowohl die Veränderungen der Ratio als auch die der absoluten Kalziumkonzentration wurden auch in anderen Studien in vergleichbarem Ausmaß beobachtet [44, 126, 219, 235].

Kontrolliert wurde das Experiment durch Zugabe gleichvolumiger HEPES-Lösung, welche keine Kalziumveränderung bewirkte. Somit konnte ein mechanisch induzierter Kalziumanstieg sowie die befürchtete zelluläre ATP-Freisetzung durch Mediumwechsel ausgeschlossen werden [76]. Die Ergebnisse waren allesamt statistisch signifikant, sodass die schnelle Erhöhung des Kalziumlevels durch ATP und Bradykinin validiert werden konnte. Der transiente Kalziumanstieg geht einher mit Resultaten der ATP-induzierten Kalziumreaktion an Par-C5-Zellen [107]: sehr hohe ATP-Konzentrationen führten zu einem biphasischen, Blebbing-induzierenden Kalziumanstieg, und niedrigere Konzentrationen bewirkten eine einfache transiente Kalziumreaktion ohne Blebbing-Effekt. P2Y_{2/12}- und P2X₇-Rezeptoren wurden in primären Osteoblasten mit hoher Sicherheit nachgewiesen [76], sodass diese als signalvermittelnde Rezeptoren am ehesten in Frage kommen.

Bei Betrachtung im Zeitverlauf tritt der Aktivator-induzierte Kalziumanstieg signifikant früher ein (< 20 s nach Aktivierung) als die Entstehung der Paxillin-haltigen Strukturen (> 50 s nach Stimulationsbeginn). Die Veränderung der Kalziumkonzentration ist nahezu abgeschlossen, wenn die Assemblierung der Paxillin-Cluster ihr Maximum erreicht. Diese Ergebnisse ähneln Resultaten von Kaczmarek und Mitarbeitern in HUVECs, u.a. stimuliert mit 100 µM ATP, was ebenfalls einen schnellen Kalziumanstieg bewirkte, wobei es zu einem 80 %-igem Anstieg der kalziumabbildenden Fluoreszenz kam [115]. Dabei wurde mittels Inhibitoren bewiesen, dass dieser Anstieg durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Lagern erfolgte, wie auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (s. unten).

Durch spezifische P2X_{1/3}-Stimulation mit α , β -Methylen-ATP konnte deren ionotrope Beteiligung an den ATP-induzierten Kalzium-Veränderungen in HUVECs ausgeschlossen werden. Mit Western-Blots demonstrierten Kaczmarek et al. die ATP-induzierte Zunahme phosphorylierten Paxillins, FAK und p130Cas [115]. Die transiente, Kalzium-abhängige Paxillin- Phosphorylierung war innerhalb von 2 Minuten maximal, was gut zur zeitlichen Entstehung der hier beobachteten Paxillin-haltigen Cluster passt. Auch in besser vergleichbaren osteoblastischen Zelllinien, wie HOBITs, konnten ähnliche Ergebnisse (Kalziumanstieg bei 100 μ M ATP-Stimulation) erzielt werden [164], wobei vor allem eine P2Y-abhängige Kaskade angenommen wird. Der ionotrope P2X₇-R, der über Membrandepolarisation spannungsgesteuerte Kalziumkanäle öffnet und somit einen Kalziuminflux von extrazellulär bewirkt [131], ist eher nicht für den Kalziumanstieg verantwortlich, da für dessen Aktivierung viel höhere ATP- Konzentrationen, als hier verwendet, nötig wären. P2X₇-Rezeptoren wurden in Osteoblasten verschiedener Spezies nachgewiesen [92].

Die Latenz zwischen dem ATP- bzw. Bradykinin-induzierten Kalzium-Peak und der Veränderung zellulärer Adhäsionskontakte bleibt hier ein ungeklärtes Phänomen [13]. Im Rahmen des Migrationsprozess wird ein differenziertes Wirkprofil lokaler Kalzium-Spitzen im Vergleich mit einem Zell-globalen Kalziumanstieg vermutet, wobei Ersteres von Giannone et al. mit einer Desintegration von fokalen Kontakten in Verbindung brachte [84]: Während lokale Kalziumanstiege nach 15 Sekunden zu einer Disassemblierung FA in U87-Astrozytomzellen führten, wurden für den globalen Effekt des Kalziumanstiegs auf die Zelle 39 ± 8 Sekunden veranschlagt. In einer früheren Publikation registrierte die gleiche Arbeitsgruppe eine Latenz von 33 ± 5 Sekunden nach einem Kalziumanstieg bis zum Einsetzen von FA-Veränderungen [83]. Diese Zeitspannen zwischen einem Kalziumeffekt und FA-Modulationen ähneln der hier beobachteten Latenz: die morphologischen Veränderungen setzten in den eigenen Messungen nach 50 - 100 Sekunden abzüglich der Zeit für die Kalziummobilisierung (~ 17 s) ein und dauerten über Minuten an. Die Registrierung von sog. Kalzium-Sparks [83], also kurzen, lokalen

Kalziumanstiegen ist, mit Mikrofluorimetrie möglich und stellt die summierten Fluoreszenzsignale der herkömmlichen Modi der Kalzium-Visualisierung in Frage [143]. Zuweilen wurden summierte globale Kalziumspitzen als Folge extrazellulärer Mediator-Stimulation auf eigentlich temporär oszillierende Kalziumwellen zurückgeführt [143].

Der beobachtete Bradykinin-induzierte Kalziumanstieg geht einher mit den Ergebnissen von Tokuda's Arbeitsgruppe [204], die eine IP_3 -Beteiligung bei Bradykinin-Stimulation und die Freisetzung des Kalziums aus intrazellulären Lagern in osteoblastischen Zellen nachwies. Wang [219] belegte sowohl einen IP_3 - als auch Ionenkanal-erzeugten Kalziumanstieg in MG63-Zellen, wobei intrazellulär gespeichertes Kalzium die Hälfte des über vierfachen Gesamtanstieg ausmachte. Bradykinin wirkt über B-Rezeptor-Hochregulierung bei der Tumorgenese mit: Beim Prostatakarzinom fördert Bradykinin die metastatische Zellmigration [236]; in Chondrosarkom-Zellen [232] wurde ein Bradykinin-aktivierter PLC-PKC δ -abhängiger Signalweg mit NF κ B-Aktivierung sowie Expressionssteigerung des $\alpha_2\beta_1$ -Integrin und gesteigerter Migrationsfähigkeit assoziiert.

Leeb-Lundberg und Kollegen berichteten, dass die Paxillin- und FAK-Phosphorylierung in 3T3-Swiss-Zellen weniger vom Kalziumlevel abhing, als von der Bradykinin-induzierten und Kalzium-unabhängigen PKC δ -Aktivität. Jedoch konnte ein Einfluss über den Kalziumsignalweg dort auch nicht ausgeschlossen werden [126]. Neuere Studien an derselben Zelllinie demonstrierten eine Bradykinin-induzierte, Kalzium-abhängige Ca^{2+} /Calmodulin/CamK2-Kaskade, die in Sekundenschnelle eine FAK-Phosphorylierung bewirkte [67]. Brechter et al. verdeutlichten die physiologische Bedeutung von Bradykinin durch dessen Rezeptor-Hochregulierung bei Entzündungsprozessen im Knochen, die durch Zellstimulation mit proinflammatorischem IL-1 und TNF- α über NF κ B-Aktivierung und MAPK-Kaskaden bedingt war [24].

Zuletzt soll die Methodik der Kalziumversuche im Kontext aktueller Literatur evaluiert werden. Kalziumdarstellung durch Fura-2AM und der Gebrauch der Ratio zur Quantifizierung des Kalziumlevels sind etablierte Verfahren [46], sodass sie

für diese Zwecke als geeignete Methode verwendet wurden. Die Betrachtung der Zellen erfolgte zweckgemäß mittels Fluoreszenzmikroskop, wobei auch konfokale Mikroskopie mit sehr gutem Ergebnis eingesetzt wurde [115].

Es wurde ein Kontrollversuch bezüglich der Herkunft des intrazellulären Kalziums durchgeführt. Da Thapsigargin die zellinterne Kalziumquelle ausschaltet und es zu keiner signifikanten Aktivator-induzierten Kalziumsteigerung nach Thapsigargin-Behandlung kam, ist abzuleiten, dass der ATP-bedingte Kalziumanstieg über die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgte und nicht über das Einstromen von Kalzium durch Ionenkanäle. Durch den Einsatz von Inhibitoren der intrazellulären Kalziumspeicher wie Thapsigargin oder selektive Blockung der P2X-Rezeptoren ist der Kalziumanstieg in Folge des purinerg-aktivierten Signalwegs gut erforscht, z.B. auch in osteoblastischen Zellen, MG63-Zellen und HUVECs [115]. Insgesamt kann also ein ATP-induzierter P2Y-R-vermittelter Kalziumanstieg aus intrazellulären Vorräten angenommen werden [38]. Für diese Interpretation spricht außerdem die Beobachtung, dass es nach Aktivierung der Zellen nur zu einem einzigen, sehr schnellen und transienten Kalzium-Peak kam, dem kein zweiter Anstieg folgte. Letzteres würde auf einen Kalziuminflux von außen hinweisen [177].

Die untersuchten pOB befanden sich vor Stimulation im ausgestreckten Zustand und übten durch reife und zeitlich stabile FA Adhärenz-Kräfte auf ihr Substrat aus. Die Zellen befanden sich also in einem ausbalancierten Ruhezustand (tensional homeostasis [166]). Die vorliegenden Ergebnisse legen eine kausale oder zumindest chronologische Erklärung der Kalzium-abhängigen Entstehung der beobachteten Paxillin-haltigen Cluster nahe. ATP-aktivierte Purinozeptoren induzieren laut anerkannter Hypothesen u.a. über Kalzium intrazelluläre Kaskaden, die zur Erklärung der beobachteten Effekte beitragen können. Durch die z.T. simultane Aktivierung unterschiedlicher, heterotrimerer G-Proteine nach metabotroper Purinozeptor-Stimulation durch ATP kommt es zu netzwerkartigen Kaskaden: Die P2Y-Stimulation aktiviert G_α , $G_{q/11}\beta\gamma$ und $G_i\beta\gamma$, welche die PLC β -kata-

lysierte Freisetzung von IP_3 und Diacylglycerin (DAG) triggern [177]. Der Mediator IP_3 bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum, und DAG aktiviert Kalzium-unabhängig die PKC δ , wie auch andere Kinasen [89]. Diese führen 1. über MAPK-Kaskaden zur NF κ B-Aktivierung gefolgt von einer Hochregulierung von Integrinen [167]; 2. zur Aktivierung von Pyk2, der sich eine Rac1-Aktivierung anschließt, die sowohl ERK1/2 als auch JNK1 stimulieren kann, 3. zur Integrin-Clustering, dem die Rekrutierung von FA-Proteinen folgt [136], und 4. zur PLA $_2$ -abhängigen verstärkten Arachidonsäure-Produktion. Über Kalziumanstieg und DAG-Freisetzung kommt es außerdem zur Aktivierung des FA-Strukturproteins Talin, gefolgt von GEF-induzierter RAP-1-GTPase-Aktivierung, die dann RIAM (Rap1-GTP-interacting adapter molecule) bindet und Talin an die Plasmamembran zu Integrin-Clustern rekrutiert. Über Paxillin-Phosphorylierung kann das Aktivitätsniveau der kleinen GTPasen lokal reguliert werden, wobei GAP-Rekrutierung eine Rho A-Hemmung und Rac-Aktivierung bewirkt. Rho A stimuliert die Bildung von Stressfasern sowie die FAK- und Vinculin-abhängige FA-Reifung in stabilere größere Aggregate [59].

Der stimulierte Purinozeptor P2Y $_{11}$ bewirkt die Aktivierung von G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} und G α_0 , wobei die G $\beta\gamma$ -Einheit Src direkt aktivieren kann. P2Y-Stimulation kann über Aktivierung von G $_0$ direkt zu einer Rac1-Aktivierung beitragen [133], andererseits aber auch über G $\alpha_{12/13}$ eine Rho A-Aktivierung bewirken, der sich ROCK-abhängige Stressfaser-Formierung, Aktingerüst-Reorganisation und FA-Assemblierung anschließen [177]. In diesem Zusammenhang kommt es auch zur FAK-Phosphorylierung, dem die Bildung des FAK-Src-Paxillin-Komplexes in naszierenden FA anschließt, was eine Phosphorylierung von Paxillin induziert. Die Phosphorylierung der FAK kann auch Kalzium-abhängig über die Ca $^{2+}$ /Calmodulin/CamK2-Kaskade erfolgen oder über Integrin-EZM-Adhäsion induziert werden.

Des Weiteren bedingt CamK2, deren membrannähe Präsenz mittels TIRF nachgewiesen wurde, einerseits ein phosphatasenbedingtes FA-Turnover im Rahmen der Dephosphorylierung gewisser FA-Proteine, vermittelt aber auch

Paxillin-Targeting an FA über Serinphosphorylierung, sowie eine Tiam1-abhängige Rac1 Aktivierung [60]. Die Kalzium-abhängige CamK2-Aktivierung führt außerdem zur Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die über Myosin-Phosphorylierung und Inaktivierung der antagonistischen Phosphatase eine gesteigerte Aktin-Myosin-Kontraktilität bewirkt. Dies kann auch über aktivierte ERK und den Rho A-ROCK-Signalweg veranlasst werden.

PyK2 wird ebenfalls über GPCR durch ein erhöhtes Kalziumniveau aktiviert [201] und so an FA rekrutiert [177]. PyK2-Aktivität führt über EGFR-Transaktivierung zur Pi3K-Aktivierung und bedingt außerdem direkte Paxillin-Phosphorylierung [201] mit FA-Turnover-Induktion. PyK2-bedingte Rac1-Aktivierung induziert die FA-Assemblierung über gesteigerte Integrin-Expression und spezielle Serin-Phosphorylierung von Paxillin durch JNK1 [118]. Ein Kalziumanstieg führt konzentrationsabhängig zur Diffusion von Integrinen aus stabilen FA und zur Aktivierung der Protease Calpain [42], was beides eine FA-Destabilisierung einleitet. Manche FA reagieren auf Kalziumanstiege dynamisch, andere sind weniger betroffen - scheinbar wird eine grenzwertüberschreitende Signalintegration zum FA-Turnover benötigt [84]. Calpain führt einerseits über PTP-Proteolyse zur verstärkten Src-Aktivität mit FA-Assemblierungsfolge; durch die Calpain-bedingte Paxillin-Fragmentierung werden jedoch für FA-Assemblierung essentielle Aktin-Bindestellen abgebaut. Calpain induziert außerdem über Talin- und FAK-Fragmentierung eine Disintegration von FA. Aktuell wird Calpain als FA-destabilisierender Komponente betrachtet [42].

Verstärktes FA-Turnover wird auch über eine verlängerte, Kalzium-abhängige Verweildauer von FAK in FA mit Autophosphorylierung an Tyr397 induziert [85]. Dem folgt über eine FAK-katalysierte Paxillin-Phosphorylierung eine positive Feedback-Schleife mit gesteigerter FAK-Affinität von Paxillin. FAK-Aktivierung reduziert durch Phosphorylierung die Affinität von α -Aktinin zu Aktin, was den Adhärenzkomplex vom Aktinnetzwerk abkoppelt und auflösen lässt.

Die FAT-Domäne (focal adhesion targeting) der FAK bindet im phosphorylierten

Zustand in einer 1:1 Stöchiometrie an Paxillin. Die FAT-Domäne beinhaltet zwei nicht-redundante Paxillin-Bindestellen, die beide für eine Proteininteraktion nötig sind [182]. Während die Rekrutierung von Paxillin an FA von Myosin unabhängig sein soll, wurde die Rekrutierung der FAK-Kinase als kontraktilitätsabhängig beschrieben [160]. Die konsekutive Phosphorylierung von Paxillin durch FAK ermöglicht eine Bindung des Komplexes Crk2-CAS-DOCK180 an Paxillin, was über cdGAP [50] Rac1 aktiviert [159] und Rho inaktiviert. Gesteigerte Rac1-Aktivität bedingt ein verstärktes FA-Turnover und soll die immobile Fraktion von Paxillin steigern [50]. Auch andere Kinasen phosphorylieren Paxillin, u.a. PAK1, Src, Rack1, JNK, ERK, PKC [176], Abl und CDK5 [48]. Die phosphorylierungsabhängige Bindung der SH3-Domäne von Src an Paxillin ermöglicht die Assoziation des Pix-GIT1/2-Pak-Nck-Komplexes, der ebenfalls Rac1 aktiviert, indirekt aber auch dessen Aktivitätsterminierung reguliert.

Erhöhtes FA-Turnover wird auch mit reduzierter innerzellulären TF in Verbindung gebracht, sodass nachlassende Zugkraft an einzelnen FA mit deren Disassemblierung einher geht [159]. Die simultane, räumlich getrennte Aktivität von Rho und Rac ist für die migrationsantreibende Zellspannung, Adhäsion, Ablösung sowie lokalen Kraftaufbau essentiell. Der Kontraktilität wurde aber auch eine Rolle in der Assemblierungsinduktion frühster fokaler Komplexe zugesprochen [206], was über kontraktilitätsbedingte Clusterung von FA-Strukturproteinen (z.B. Talin) erklärt wurde [59]. Neuere Berichte gehen eher von einer Myosin-unabhängigen FA-Reifung aus, wobei entweder eine Integrin-Modulation bei EZM-Kontaktaufnahme oder eine Aktin-Akkumulation, abhängig vom Actin-related Protein 2/3 (Arp2/3), auftreten soll.

Letztlich müssen Integrine beleuchtet werden, über deren mechanotransduktive Outside-in-Aktivierung FA-Assemblierung induziert wird. ATP beeinflusst Integrine über P2Y2-R-vermittelte Kaskaden [115]. Integrinexpression wird bei zellulärem Stress hochreguliert [9], sodass die Effekte von stressbedingter Nukleotidstimulation auf die Zelle potenziert und die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf solche Stimuli gebahnt werden [37]. Unabhängig von sekundären Kaskaden

hat die Aktivierung von Purinozeptoren auch direkten (physischen) Einfluss auf Integrine und somit auf die Adhärenz-Maschinerie [277]. P2Y-Rezeptoren besitzen eine RGD-Domäne im helikalen Anteil, über die $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine bei Nukleotid-Stimulation rekrutiert und aktiviert werden können [223]. Die Rezeptor-vermittelte $G_{0/12}$ -Aktivierung soll sogar von der α_v -Integrin-Assoziation abhängig sein [133], und die $\alpha_v\beta_5$ -Integrinbindung an den aktivierten P2Y2 scheint erst eine maximale FAK-Aktivierung einzuleiten [115]. Außerdem führt die Aktivierung metabotroper Purinozeptoren über die intrazelluläre SH3-Domäne zur Src-Aktivierung, welche die Phosphorylierung von FAK, Phosphoinositid-3-Kinase (Pi3K) [62] und Pyk2 [140] bewirkt. Src-Überaktivierung bedingt in osteolytischen Metastasen Knochenresorption und gesteigertes Migrationsverhalten [4].

Auch Bradykinin-Stimulation bewirkt die intrazelluläre Rekrutierung und Aktivierung von $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen. GPCR-getriggerte Integrin-Rekrutierung induziert u.a. eine migrationsfördernde Rac-Kaskade. Der ATP-getriggerte Migrationsprozess von Astrozyten war von der P2Y₂-RGD-Domäne hinsichtlich der assoziierten Pi3K und ERK-Kaskaden abhängig [220]. Die Phosphoinositid-3-Kinase induzierte dabei GEF-abhängig die Rac1-Aktivität. Im Rahmen der ATP-induzierten CamK2-Aktivierung kommt es zur β_1 -Integrin-Phosphorylierung, was die Cluster-Bildung von Integrinen terminieren soll [60] und somit eine Reaktionslimitation auf ATP-Stimulation darstellen könnte. Zusammenfassend lässt sich die beobachtete lokale Rekrutierung von Paxillin bei Nukleotid-Stimulation vielleicht zum Teil auf eine Rezeptor-vermittelte Integrin-Aktivierung zurückführen. Der purinerg-vermittelte Kalziumeffekt darf dabei jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

Für extrazelluläres ATP und neuerdings auch Bradykinin [61] sind Regulations-effekte auf transkriptioneller Ebene bekannt. ATP führt über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun (über JNK), c-Fos (über ERK) oder NF κ B zur gesteigerten Proteinexpression, z.B. von Metalloproteasen. Dies führt insgesamt zu einer proresorptiv Wirkung auf den Knochen [17]. Die c-Fos-Expression re-

guliert das Knochen- Remodeling durch Hemmung von Wachstum und Mineralisierung. Im P2X₇-Nullmodell wurde eine verlangsamte Kallusumstrukturierung an Knochenbrüchen beobachtet [132]. Die Stimulation mit ATP oder Bradykinin simuliert eine inflammatorische Gewebesituation, wie sie bei Wunden, Parodontitis [91], Osteomyelitis, starker mechanischer Belastung oder im Tumorstroma auftritt.

Extrazelluläres ATP ist eines der ersten Danger-Signale gefolgt von Zytokin-Ausschüttung, was Migrationsverhalten, Differenzierung und Zellposition im Gewebekomplex modifiziert [21]. Nukleotide können über eine PLC-PKC-PLA₂-abhängige Signalkaskade zur gesteigerten PGE₂-Synthese führen, was eine veränderte Knochenformation veranlasst. Auch die osteoblastische Sekretion von IL-6 soll über ATP- und auch Bradykinin-Stimulation initiiert werden [168]. Weitere mitogene Effekte übt ATP über einen Synergismus mit Platelet-derived growth factor (PDGF) und IGF aus [101]. Liganden-Bindung des P2Y₂-Rezeptors führt über eine Kalzium-abhängige Kaskade und ERK-Aktivierung zur Expressionsinduktion von Runx2, was mit Veränderungen im Knochenstoffwechsel in Verbindung gebracht wurde [16]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch eindrücklich, dass extrazelluläres ATP auch auf zytoarchitektonischer Ebene Wirkungen zeigt. Die Zelle reagiert also mit multi-modalen Anpassungsmechanismen.

In der Wundflüssigkeit liegen bekanntlich erhöhte ATP-Konzentrationen vor [129]. Epithelzellen während der Wundheilung zeigten sowohl einen intrazellulären Kalziumanstieg als auch Lamellipodia-Ausbildung, was nicht bei P2Y₂-Knockdown-Zellen vorkam. Wundheilungsbedingtes ATP ist demnach mitverantwortlich für das verstärkte Migrationsverhalten und die veränderte Zytoskelett-Architektur, wobei Kalzium ein zentraler Vermittler zu sein scheint [20]. Zellmigration ins Wundgebiet wurde des Weiteren mit Rac-Aktivierung, Rho-Inhibition und zellpolarisierender CDC42-Aktivität assoziiert, was zusammen mit gesteigertem FA-Turnover beobachtet wurde [154]. Die hier beobachtete rasante Entwicklung von membranassoziierten Paxillin-enthaltenden Protrusionen lässt

sich gut in einen ATP-assoziierten Wundheilungs- bzw. Entzündungskontext von Knochengewebe einordnen. Teranishi et al. beobachteten eine bei Verletzung gesteigerte Aktivität von ERK, JNK und p38, eine Steigerung der FA-Formierung sowie einen Anstieg der Paxillin- und FAK-Phosphorylierung [202]. Die zum Wundverschluss erforderliche Zellmotilität war also abhängig von verstärktem FA-Turnover sowie verstärkter Paxillin-Phosphorylierung.

Neben mitogenen Effekten auf Osteoblasten via P2Y-Rezeptoren wirkt ATP inhibitorisch auf die Knochenformation. Extrazelluläres ATP sensibilisiert Knochenzellen auf das knochenabbauende PTH und bewirkt somit einen Synergismus von systemischen und lokalen Mediatoren, was lokal differenzierte Effekte auf systemische Mediatoren erklärt [164]. Steigende Evidenz legt eine vermittelnde Beziehung von extrazellulären Nukleotiden und Skelettanpassung bei mechanischer Belastung nahe [158]. Diese soll zu ATP-Freisetzung aus Osteoblasten führen und parakrin Purinozeptoren aktiviert. Genetos et al. zeigten eine über Shear-Stress induzierte NF κ B- Aktivierung, wobei Shear-Stress zur parakrinen ATP-Stimulation der Osteoblasten führte [81], was u.a. gesteigerte Cyclooxygenase-2-Aktivität und PGE₂-Produktion bewirkte. Dabei wurde P2Y₆-R und P2X₇-R als vermittelnder Rezeptor identifiziert. Auch andere Transkriptionsfaktoren wie Erg-1 werden in ATP-Abhängigkeit durch Shear-Stress induziert [164]. Somit kann die mechanotransduktive Fähigkeit von Knochenzellen über perizelluläre Mediatoren Einfluss auf die Genexpressionsebene nehmen und die Zelle an die mechanische Belastung anpassen, wozu sicherlich eine Modifikation der Zytoskelettstruktur nötig ist. Parakrines ATP stellt im Knochenzellumfeld außerdem eine Art Transmitter dar: ein über lokale mechanische Stimulation induzierter Kalziumanstieg in einer Zelle vermittelt über ATP-Freisetzung diesen Effekt parakrin und Gap-Junktion-unabhängig auf umliegende Zellen, sodass eine ATP-abhängige interzelluläre Kalziumwelle beobachtet werden konnte [106]. Dies scheint jedoch abhängig von der Zellmorphologie zu sein, da die Mechanosensitivität an Zellausläufern besonders ausgeprägt ist [3]. Mechanische Belastung führt außerdem zu einer gesteigerten Produktion des BMP Osteo-

pontin, das Migrationsverhalten und Knochen-Remodeling fördert. Die mechanisch stimulierte Osteopontin-Induktion ist dabei abhängig von parakriner ATP-Ausschüttung, P2Y₁-Rezeptorstimulation und ROCK-Aktivierung [228].

ATP hemmt die Knochenmineralisierung v.a. über P2Y₂-R, sodass dieser Rezeptor eine pharmakologische Zielstruktur darstellt. Gerade reife Osteoblasten weisen durch Hochregulierung von P2Y₂-R eine relativ hohe ATP-Sensitivität auf [117]. Extrazelluläres ATP führt außerdem zu einer lokaler Gewebsansäuerung durch Ca²⁺/Pi3K-abhängige Protonensekretion, was mit Knochensubstanzresorption und verlangsamter Osteoidmineralisierung einhergeht [93]. Über eine Reduktion des lokalen ATP bzw. dessen Rezeptorinhibition könnte auch dieser Mechanismus angegriffen werden. ATP wird außerdem typischerweise von Osteoklasten [22] und bei Vitamin-D₃-Stimulation von Osteoblasten freigesetzt [19, 41]. Ostrom et al. beschrieben die Wirkung einer basalen ATP-Präsenz im Rahmen eines zellulären „Set-Point“, also einer geringen, aber dauerhaften Aktivierung basaler Signalkaskaden [157]. Eine neuere klinische Studie bestätigte, dass die polymorphismus-bedingte Funktionsreduktion von P2X₇-R in Knochenzellen mit einem erhöhten Risiko der postmenopausalen Osteoporose assoziiert ist [114].

Interessanter Weise wurde ein erhöhter ATP-Spiegel in Tumorgeweben festgestellt [162], möglicherweise bedingt durch die begleitende Entzündungsreaktion, tumorassoziierte Hypoxie, hochreguliertem Enzymkatabolismus oder herunterregulierten Ekto-Nukleotidasen [148]. ATP wurde demnach eine Rolle in der Tumorgenese, -progression und -metastasierung zugeordnet [41]. Die mitogene Wirkung von ATP [128], seine rezeptorabhängige immunsuppressive Wirkung [88], die Induktion von bahnnenden Metalloproteasen [41], sein stimulierender Einfluss auf die Angiogenese – all diese Aspekte sind Charakteristika eines „erfolgreichen“ Tumors. Krebszellen haben einen hohen intrazellulären ATP-Gehalt und können dieses auf nicht-lytische, exozytotische Weise freisetzen [217]. Sogar der lange mit zytotoxischen Effekten assoziierte P2X₇-R, der in Tumoren oft überexprimiert ist, scheint bei Stimulation mit den hohen ATP-

Konzentrationen der Tumor-Mikroumgebung (microenvironment) proliferative und überlebenssteigende Effekte zu haben und wird sogar als pharmakologisches Target betrachtet [53]. Injektion von Apyrase zur ATP-Degradierung führte sogar zur Schrumpfung von CNS-Tumoren im Mausmodell [148].

Die inflammatorisch und onkogen gesteigerte extrazelluläre ATP-Präsenz der Tumor-Mikroumwelt motiviert aufgrund der hier beobachteten Paxillin-Rekrutierung zu weiteren Überlegungen zur Rolle von Paxillin in der Karzinogenese. Veränderungen des Zytoskelett sind bekannter Weise am Migrations- und Invasionsverhalten maligner Zellen beteiligt [121]. Im Mamma-Karzinom und im Melanom wurde eine Rac1-abhängige, gestreckte Zellmorphologie, Membranprotrusionen sowie ein Rho A-bedingtes, transient reduziertes Adhäsionsverhalten beobachtet. Plastizität, Invasivität und Metastasierung wurden von Deakin und Turner im Zusammenhang mit Paxillin untersucht [49]. Dabei war Paxillin zur Stabilisierung und Reifung naszierender FA sowie im Disassemblierungsprozess reifer FA unentbehrlich. Des Weiteren kommt es ATP-abhängig zur Steigerung der PGE₂-Produktion gefolgt von einer Adhäsionsreduktion und einer Migration mit Invasionspotential. Die Blockierung der Cyclooxygenase-2 und der PGE₂-Akkumulierung sowie die Antagonisierung von Integrinen werden darum in der Tumorthherapie als pharmakologische Ziele untersucht [144]. Auch die Inhibition der Paxillin- und FAK-Phosphorylierung wird pharmakologisch in Betracht gezogen, da sie präklinisch eine Reduktion des Metastasierungsprozess bewirkte [95].

Was Knochengewebe betrifft kam es zu einer gesteigerten, Src-abhängigen Paxillin-Phosphorylierung in Osteosarkomzellen, wobei Src in vielen malignen Zelllinien hochreguliert ist [7]. Der resorptionsstimulierende Effekt von ATP trägt ferner zum osteolytischen Verhalten von Knochenmetastasen bei [32]. Über 75 % der malignen Tumore führen im fortgeschrittenen Stadium zu ossären Metastasen, die als extrem schmerzhaft gelten und somit gerade in der Palliativmedizin neue Therapieansätze fordern. Knochengewebe mit konstitutiv erhöhten ATP-Levels gewährt metastasierenden Tumorzellen eine proliferationsfördernde

Mikroumgebung und somit eine gute Wachstumsgrundlage [217]. Knochenmetastasen bewirken lokal gesteigerte ATP- und Bradykinin-Konzentrationen, was über Purinozeptoren und B2-Rezeptoren schmerzpotenzierende Knochenresorption, Osteolyse und Osteoklastogenese vermittelt [120]. P2X_{2/3}-Rezeptoren sollen an der lokalen Nozizeption beteiligt sein und konnten im Mausmodell über spezifische Blockierung eine metastasenbedingte Osteolyse reduzieren, wovon man sich in der Onkologie eine Schmerzreduktion verspricht [192].

Im Rektumkarzinom [230], dem zystischen Speicheldrüsenkarzinom [243], dem Prostatakarzinom [185] und bei Lungenkarzinom [109] wurde eine Paxillin-Hochregulierung beobachtet, die mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Metastasierung korrelierte. Auch die Angiogenese-Induktion konnte mit Paxillin in Verbindung gebracht werden. Die Expressionsrate von Paxillin hat auf verschiedene Tumore z.T. gegensätzliche Effekte ergeben, sodass eine gewebs- und situationsabhängige Beziehung von Paxillin und Tumorgenese angenommen werden muss [165]. Paxillin spielt demnach in der Karzinogenese eine wichtige und ggf. pharmakologisch relevante Rolle.

Abschließend seien noch einmal folgende Punkte zusammengefasst:

- Adhärenz-Eigenschaften von primären bovinen Osteoblasten konnten anhand der Traction-Force-Mikroskopie quantitativ in einer realistischen Größenordnung gemessen werden. Die dabei beobachtete, zeitliche Kraftveränderung sowie die Verteilung fokaler Adhärenzstrukturen legen eine dynamische und z.T. aktive Beteiligung des Zytoskeletts bei dem Trypsin-induzierten Ablösevorgang nahe, was nicht nur für den Versuchsaufbau, sondern auch im Bezug auf die Zellmigration von Bedeutung sein könnte.
- Paxillin konnte in adhärenenten pOB mittels Fluoreszenzmikroskopie in FA nachgewiesen und dessen Redistributionsdynamik an reifen FA mittels FRAP dargestellt werden. Die Aktivator-induzierte Paxillin-Rekrutierung in naszie-

renden FA in Echtzeitbeobachtung gemessen war um ein bis zwei Größenordnungen langsamer als die schnelle Kinetik von Paxillin an individuellen FA. Die Effekte der ATP- und Bradykinin-Stimulation auf eGFP-Paxillin-exprimierenden Zellen konnten multimodal dargestellt werden. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme transienter Paxillin-haltiger Cluster, die mit einer Latenz von 100 s verteilt über die gesamte Zellperipherie auftraten. Die Zunahme war über 20 Minuten progredient und innerhalb weiterer 10 Minuten rückläufig. Ähnliche Effekte auf die Zytoskelett-Architektur wurden auch nach Bradykinin-Stimulation beobachtet.

- Der erwartete Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration konnte in realistischer Größenordnung für beide Stimulationsbedingungen nachgewiesen werden und liegt mit seinem Maximum deutlich unter dem Auftreten der Zytoskelett-Änderungen. Im Vergleich zu Bradykinin induzierte ATP einen signifikant stärkeren intrazellulären Kalziumanstieg, sodass eine effektivere Wirkung von ATP gegenüber Bradykinin in den gewählten Konzentrationen angenommen wird.
- Der Austausch von Paxillin an reifen FA und der Stimulus-induzierte Kalziumanstieg sind als schnelle Prozesse zu charakterisieren, welche den Zeitverlauf der Paxillin-Clusterung an Schnelligkeit weit übertreffen und somit eine komplexe Signalkaskade zwischen Rezeptor-Besetzung, Kalziumanstieg und Paxillin-Redistribution vorliegen muss.
- Obwohl eine Kalzium-unabhängige Kopplung von Stimulus und Reorganisation der Adhärenz-Maschinerie nach dem heutigen Wissensstand von intrazellulären Signalkaskaden möglich ist, nämlich über die direkte GPCR-Kopplung mit Kalzium-unabhängigen Kinasen (PKC δ), RhoA, Rac und Integrinen, wird hier wegen der zeitnahen Abfolge, ein Aktivator-induzierter, Kalzium-abhängiger Signalweg vorgeschlagen.
- Zur Erweiterung der vorliegenden Arbeit sollten Folgearbeiten die genaue

Charakterisierung der Rezeptorbesetzung (P2Y/X, B1/2) der untersuchten pOB, die Differenzierung des Phosphorylierungsstatus der Stimulus-induzierten Paxillin-Umverteilung sowie eine Analyse der Zugkraftveränderung bei biochemischer Stimulation unter Einsatz moderner Techniken in Erwägung ziehen. Daran anknüpfend muss die vorgeschlagene Hypothese eines Kalzium-medierten Signalwegs, die auf einer zeitlichen Ereignisabfolge basiert, mechanistisch geprüft werden, indem Kaskadenbestandteile zum Beispiel über Inhibitions- oder Knock-out-Techniken validiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Funktionalität des Skelettsystems beruht auf der mechanosensitiven und mediatorresponsiven Anpassung des Knochengewebes an äußere Ereignisse. Mechanische Kraftbeanspruchung, Wachstum, Entzündung und Karzinogenese erfordern morphologische Veränderungen des Gewebes, welche auf der Adaptivität der einzelnen Zellen beruhen. In dieser Arbeit wurde die Reaktion von primären bovinen Osteoblasten (pOB) auf eine Stimulation mit extrazellulärem ATP (100 μ M) und Bradykinin (1 μ M) hinsichtlich der subzellulären Verteilung des FA-Proteins Paxillin und Veränderungen im intrazellulären Kalziumspiegel untersucht. Unter ATP- oder Bradykinin-Stimulation kam es in eGFP-Paxillin-exprimierenden pOB zur schnellen Umverteilung von Paxillin in transiente fokale Cluster mit zeitlich vorausgehendem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Mittels Phasenkontrastmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und TIRF-Mikroskopie konnten 100 Sekunden nach der Stimulation der Osteoblasten Paxillin-haltige Aggregate in der Zellperipherie beobachtet werden, deren Entwicklung innerhalb von 25 Minuten rückläufig war. Behandlung mit beiden Mediatoren induzierte innerhalb von 20 Sekunden, und somit vor den sichtbaren Zytoskelett-Veränderungen signifikante Kalziumanstiege, die über den Kalziumindikator Fura-2AM gemessen wurden. Mittels FRAP-Technologie konnten zudem hohe Austauschraten von eGFP-markiertem Paxillin in stabilen, maturierten FA dokumentiert werden. Die schnellen, mehr-phasischen und nahezu kompletten Austauschprozesse von Paxillin in reifen FA lassen auf eine hohe, dynamische Mobilität des Proteins innerhalb des Zytoplasmas schließen. Die Latenz zwischen den Veränderungen des Kalziumspiegels und der Entstehung von Paxillin-haltiger Membranstrukturen weist auf komplexe Signalkaskaden hin.

6 Englische Zusammenfassung - Abstract

The comprehensive roles of the skeleton rely on the mechanosensitive and mediator-responsive cellular response to external stimuli. Mechanical strain, growth, inflammation and carcinogenesis demand morphological adaptations of bone tissue, which are based on the adaptability of the cytoskeleton. This thesis reports changes in the subcellular distribution of the focal adhesion (FA) protein paxillin and intracellular calcium levels upon stimulation of cultured primary bovine osteoblasts (pOB) with extracellular ATP (100 μ M) or bradykinin (1 μ M). Stimulation with ATP or bradykinin induced a rapid redistribution of eGFP-tagged paxillin into newly formed, transient clusters at the plasma membrane, which was preceded by a significant rise in intracellular calcium concentrations. Using phase contrast and fluorescence microscopy as well as TIRF microscopy, these paxillin-containing clusters were observed at the cell periphery. They occurred 100 seconds after the addition of the ligands and vanished after 25 minutes. Using Fura-2AM, both ligands produced a significant calcium elevation within 20 seconds, which clearly preceded the changes of the cytoskeleton. FRAP analysis confirmed the rapid and nearly complete exchange of eGFP-tagged paxillin at stable, mature FAs, indicating the high mobility of paxillin and its fast recruitment to FAs. The latency between the maximal calcium peak and the subsequent cytoskeletal changes including the formation of paxillin-containing, membrane associated aggregates suggests complex signal cascades.

7 Literaturangaben

1. Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM (1971) The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* 67:359-367
2. Abou Zeid N, Vallés AM, Boyer B (2006) Serine phosphorylation regulates paxillin turnover during cell migration. *Cell Commun Signal* 4:8
3. Adachi T, Aonuma Y, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H (2009) Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J Biomech* 42:1989-1995
4. Araujo J, Logothetis C (2009) Targeting Src signaling in metastatic bone disease. *Int J Cancer* 124:1-6
5. Axelrod D (1981) Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* 89:141-145
6. Ay C, Yeh CC, Hsu MC, Hurng HY, Kwok PC, Chang HI (2012) Evaluation of the Correlation between Focal Adhesion Kinase Phosphorylation and Cell Adhesion Force Using "DEP" Technology. *Sensors (Basel)* 12:5951-5965
7. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R (2005) Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24:4754-4764
8. Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P (2006) The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One* 1:e54
9. Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, Erb L (2005) The P2Y2 nucleotide receptor interacts with α v integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem* 280:39050-39057
10. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3:466-472
11. Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak GR (1999) Detection of local

- ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am J Physiol* 276:C267-278
12. Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL (2001) Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 153:881-888
 13. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21
 14. Berrier AL, Yamada KM (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565- 573
 15. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B (2003) Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:677-695
 16. Biggs MJ, Dalby MJ (2010) Focal adhesions in osteoneogenesis. *Proc Inst Mech Eng H* 224:1441-1453
 17. Birkedal-Hansen H (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 28:500-510
 18. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
 19. Biswas P, Zanello LP (2009) 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ induction of ATP secretion in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 24:1450-1460
 20. Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V (2010) The P2Y $_2$ receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C411-421
 21. Bours MJ, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di Virgilio F (2011) P $_2$ receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:1443-1456
 22. Brandao-Burch A, Key ML, Patel JJ, Arnett TR, Orriss IR (2012) The P2X $_7$ Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:41
 23. Brechter AB, Lerner UH (2007) Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum* 56:910-923
 24. Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH (2008) Kinin B $_1$ and B $_2$ receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by in-

- terleukin-1 and tumour necrosis factor- α . Effects dependent on activation of NF- κ B and MAP kinases. *Bone* 43:72-83
25. Brown MC, Turner CE (2004) Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84:1315-1339
 26. Buckley KA, Hipkind RA, Gartland A, Bowler WB, Gallagher JA (2002) Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Bone* 31:582-590
 27. Buckwalter JA, Cooper RR (1987) Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36:27-48
 28. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145:527-538
 29. Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR (2013) Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal* 9:541-572
 30. Burton K, Park JH, Taylor DL (1999) Keratocytes generate traction forces in two phases. *Mol Biol Cell* 10:3745-3769
 31. Böhm I, Schild H (2003) Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* 5:2-14
 32. Carter RL (1985) Patterns and mechanisms of bone metastases. *J R Soc Med* 78 Suppl 9:2-6
 33. Charras G, Paluch E (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:730-736
 34. Charras GT, Coughlin M, Mitchison TJ, Mahadevan L (2008) Life and times of a cellular bleb. *Biophys J* 94:1836-1853
 35. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR (2008) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* 10:1039-1050
 36. Choi CK, Zareno J, Digman MA, Gratton E, Horwitz AR (2011) Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J* 100:583-592
 37. Chorna NE, Chevres M, Santos-Berrios C, Orellano EA, Erb L,

- González FA (2007) P2Y2 receptors induced cell surface redistribution of alpha(v) integrin is required for activation of ERK 1/2 in U937 cells. *J Cell Physiol* 211:410-422
38. Conigrave AD, Jiang L (1995) Review: Ca(2+)-mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium* 17:111-119
 39. Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105:1473-1478
 40. Copp DH (1969) Endocrine control of calcium homeostasis. *J Endocrinol* 43:137-161
 41. Corriden R, Insel PA (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1
 42. Cortesio CL, Boateng LR, Piazza TM, Bennin DA, Huttenlocher A (2011) Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J Biol Chem* 286:9998-10006
 43. Coutant KD, Corvaia N, Ryder NS (1995) Bradykinin induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor-receptor and focal adhesion proteins in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 210:774-780
 44. Cox CI, Leese HJ (1995) Effect of purinergic stimulation on intracellular calcium concentration and transepithelial potential difference in cultured bovine oviduct cells. *Biol Reprod* 52:1244-1249
 45. Curtze S (2004) Zugkraftmikroskopie an Osteoblasten. Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik. Philipps-Universität Marburg
 46. da Cruz CM, Ventura AL, Schachter J, Costa-Junior HM, da Silva Souza HA, Gomes FR, Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Persechini PM (2006) Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X7-associated pore or channel formation. *Br J Pharmacol* 147:324-334
 47. de Baat P, Heijboer MP, de Baat C (2005) [Development, physiology, and cell activity of bone]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 112:258-263
 48. Deakin NO, Turner CE (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121:2435-2444
 49. Deakin NO, Turner CE (2011) Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis. *Mol*

50. Deakin NO, Ballestrem C, Turner CE (2012) Paxillin and Hic-5 interaction with vinculin is differentially regulated by Rac1 and RhoA. *PLoS One* 7:e37990
51. Dembo M, Wang YL (1999) Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 76:2307-2316
52. Deramandt TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, Takeda K, Rondé P (2011) FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell* 22:964-975
53. Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009) P2X(7): a growth-promoting receptor- implications for cancer. *Purinergic Signal* 5:251-256
54. Digman MA, Brown CM, Horwitz AR, Mantulin WW, Gratton E (2008) Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys J* 94:2819-2831
55. Doan AT, Huttenlocher A (2007) RACK1 regulates Src activity and modulates paxillin dynamics during cell migration. *Exp Cell Res* 313:2667-2679
56. Doyle A, Marganski W, Lee J (2004) Calcium transients induce spatially coordinated increases in traction force during the movement of fish keratocytes. *J Cell Sci* 117:2203-2214
57. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504
58. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G (2001) Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 114:3285-3296
59. Dumbauld DW, Shin H, Gallant ND, Michael KE, Radhakrishna H, García AJ (2010) Contractility modulates cell adhesion strengthening through focal adhesion kinase and assembly of vinculin-containing focal adhesions. *J Cell Physiol* 223:746-756
60. Easley CA, Brown CM, Horwitz AF, Tombes RM (2008) CaMK-II promotes focal adhesion turnover and cell motility by inducing tyrosine dephosphorylation of FAK and paxillin. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:662-674
61. Ehrenfeld P, Matus CE, Pavicic F, Toledo C, Nualart F, Gonzalez CB,

- Burgos RA, Bhoola KD, Figueroa CD (2009) Kinin B1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family. *J Leukoc Biol* 86:1179-1189
62. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452:552-562
 63. Erb L, Weisman GA (2012) Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*
 64. Espejo R, Rengifo-Cam W, Schaller MD, Evers BM, Sastry SK (2010) PTP- PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C454-463
 65. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG (2005) Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 7:581-590
 66. Fackler OT, Grosse R (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* 181:879-884
 67. Fan RS, Jácomo RO, Jiang X, Sinnott-Smith J, Rozengurt E (2005) G protein- coupled receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843. Mediation by Ca²⁺, calmodulin, and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* 280:24212-24220
 68. Feng D, Marshburn D, Jen D, Weinberg RJ, Taylor RM, Burette A (2007) Stepping into the third dimension. *J Neurosci* 27:12757-12760
 69. Fleming I, Busse R (1997) Tyrosine phosphorylation and bradykinin-induced signaling in endothelial cells. *Am J Cardiol* 80:102A-109A
 70. Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485-492
 71. Fraley SI, Feng Y, Krishnamurthy R, Kim DH, Celedon A, Longmore GD, Wirtz D (2010) A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol* 12:598-604
 72. Franz CM, Müller DJ (2005) Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *J Cell Sci* 118:5315-5323
 73. Frost HM (1987) The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism

- of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and non-mechanical agents. *Bone Miner* 2:73-85
74. Frost HM (2001) From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec* 262:398-419
 75. Frost NA, Lu HE, Blanpied TA (2012) Optimization of cell morphology measurement via single-molecule tracking PALM. *PLoS One* 7:e36751
 76. Gallagher JA, Buckley KA (2002) Expression and function of P2 receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:432-439
 77. Gallagher JA (2004) ATP P2 receptors and regulation of bone effector cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4:125-127
 78. Gallant ND, Michael KE, García AJ (2005) Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell* 16:4329-4340
 79. Gardel ML, Sabass B, Ji L, Danuser G, Schwarz US, Waterman CM (2008) Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *J Cell Biol* 183:999-1005
 80. Geiger T, Zaidel-Bar R (2012) Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome. *Curr Opin Cell Biol*
 81. Genetos DC, Karin NJ, Geist DJ, Donahue HJ, Duncan RL (2011) Purinergic signaling is required for fluid shear stress-induced NF- κ B translocation in osteoblasts. *Exp Cell Res* 317:737-744
 82. Geraldo S, Simon A, Elkhatib N, Louvard D, Fetler L, Vignjevic DM (2012) Do cancer cells have distinct adhesions in 3D collagen matrices and *in vivo*? *Eur J Cell Biol* 91:930-937
 83. Giannone G, Rondé P, Gaire M, Haiech J, Takeda K (2002) Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J Biol Chem* 277:26364-26371
 84. Giannone G, Rondé P, Gaire M, Beaudouin J, Haiech J, Ellenberg J, Takeda K (2004) Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem* 279:28715-28723
 85. Giannone G, Sheetz MP (2006) Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol* 16:213- 223

86. Gilmore AP, Burridge K (1996) Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* 4:647- 651
87. Gimona M, Kaverina I, Resch GP, Vignal E, Burgstaller G (2003) Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 14:2482-2491
88. Glaser T, Cappellari AR, Pillat MM, Iser IC, Wink MR, Battastini AM, Ulrich H (2012) Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal* 8:523-537
89. Goding JW, Grobden B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638:1-19
90. Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319
91. Graves DT, Oates T, Garlet GP (2011) Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 3
92. Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ (2009) Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic Signal* 5:205-221
93. Grol MW, Zelner I, Dixon SJ (2012) P2X₇-mediated calcium influx triggers a sustained, PI3K-dependent increase in metabolic acid production by osteoblast-like cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E561-575
94. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
95. Guarino M (2010) Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 223:14-26
96. Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:816-826
97. Hagel M, George EL, Kim A, Tamimi R, Opitz SL, Turner CE, Iamoto A, Thomas SM (2002) The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol* 22:901-915
98. Harris AK, Wild P, Stopak D (1980) Silicone rubber substrata: a new

wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208:177-179

99. Harunaga JS, Yamada KM (2011) Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biol* 30:363-368
100. Hillsley MV (1999) Methods to isolate, culture, and study osteoblasts. *Methods Mol Med* 18:293-301
101. Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G, Arnett TR (2002) ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem* 86:413-419
102. Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G (2003) Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci* 24:290-297
103. Hofbauer LC, Rauner M (2009) Minireview: live and let die: molecular effects of glucocorticoids on bone cells. *Mol Endocrinol* 23:1525-1531
104. Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K (2003) JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424:219-223
105. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179:1043-1057
106. Huo B, Lu XL, Costa KD, Xu Q, Guo XE (2010) An ATP-dependent mechanism mediates intercellular calcium signaling in bone cell network under single cell nanoindentation. *Cell Calcium* 47:234-241
107. Hwang SM, Koo NY, Choi SY, Chun GS, Kim JS, Park K (2009) P2X7 Receptor-mediated Membrane Blebbing in Salivary Epithelial Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 13:175-179
108. Ingber DE (2006) Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20:811-827
109. Jagadeeswaran R, Surawska H, Krishnaswamy S, Janamanchi V, Mackinnon AC, Seiwert TY, Loganathan S, Kanteti R, Reichman T, Nallasura V, Schwartz S, Faoro L, Wang YC, Girard L, Tretiakova MS, Ahmed S, Zumba O, Soulii L, Bindokas VP, Szeto LL, Gordon GJ, Bueno R, Sugarbaker D, Lingen MW, Sattler M, Krausz T, Vigneswaran W, Natarajan V, Minna J, Vokes EE, Ferguson MK, Husain AN, Salgia R (2008) Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion. *Cancer Res* 68:132-142

110. Jan CR, Ho CM, Wu SN, Tseng CJ (1999) Mechanism of rise and decay of thapsigargin-evoked calcium signals in MDCK cells. *Life Sci* 64:259-267
111. Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S (2007) Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci* 12:1450-1462
112. Jones DB BDHdortms (1991) How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? , *Cells and Methods* 1, pp 329-340
113. Jones SJ, Gray C, Boyde A, Burnstock G (1997) Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. *Bone* 21:393-399
114. Jørgensen NR, Husted LB, Skarratt KK, Stokes L, Tofteng CL, Kvist T, Jensen JE, Eiken P, Brixen K, Fuller S, Clifton-Bligh R, Gartland A, Schwarz P, Langdahl BL, Wiley JS (2012) Single-nucleotide polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with post-menopausal bone loss and vertebral fractures. *Eur J Hum Genet* 20:675-681
115. Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, Blusztajn JK, Trinkaus-Randall V, Weisman GA, Robson SC (2005) Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 93:735-7424
116. Katoh K, Kano Y, Noda Y (2011) Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J R Soc Interface* 8:305-311
117. Katz S, Boland R, Santillán G (2008) Purinergic (ATP) signaling stimulates JNK1 but not JNK2 MAPK in osteoblast-like cells: contribution of intracellular Ca²⁺ release, stress activated and L-voltage-dependent calcium influx, PKC and Src kinases. *Arch Biochem Biophys* 477:244-252
118. Kimura K, Teranishi S, Yamauchi J, Nishida T (2008) Role of JNK-dependent serine phosphorylation of paxillin in migration of corneal epithelial cells during wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:125-132
119. Kogianni G, Noble BS (2007) The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep* 5:81-86

120. Kondo A, Togari A (2004) Activation of osteoblastic functions by a mediator of pain, bradykinin. *Biochem Pharmacol* 68:1423-1431
121. Kumar S, Weaver VM (2009) Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 28:113-127
122. Kuo JC, Han X, Hsiao CT, Yates JR, Waterman CM (2011) Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* 13:383-393
123. Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF (2001) Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* 153:1427-1440
124. Le Dévédec SE, Geverts B, de Bont H, Yan K, Verbeek FJ, Houtsmuller AB, van de Water B (2012) The residence time of focal adhesion kinase (FAK) and paxillin at focal adhesions in renal epithelial cells is determined by adhesion size, strength and life cycle status. *J Cell Sci*
125. Lee J, Leonard M, Oliver T, Ishihara A, Jacobson K (1994) Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol* 127:1957-1964
126. Leeb-Lundberg LM, Song XH, Mathis SA (1994) Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 269:24328-24334
127. Lele TP, Thodeti CK, Pendse J, Ingber DE (2008) Investigating complexity of protein-protein interactions in focal adhesions. *Biochem Biophys Res Commun* 369:929-934
128. Lemoli RM, Ferrari D, Fogli M, Rossi L, Pizzirani C, Forchap S, Chiozzi P, Vaselli D, Bertolini F, Foutz T, Aluigi M, Baccarani M, Di Virgilio F (2004)
Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 104:1662-1670
129. Leung KS, Sher AH, Lam TS, Leung PC (1989) Energy metabolism in fracture healing. Measurement of adenosine triphosphate in callus to monitor progress. *J Bone Joint Surg Br* 71:657-660
130. Li B, Wang JH (2010) Application of sensing techniques to cellular force measurement. *Sensors (Basel)* 10:9948-9962
131. Li J, Liu D, Ke HZ, Duncan RL, Turner CH (2005) The P2X7 nucleotide

- receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem* 280:42952- 42959
132. Li J, Meyer R, Duncan RL, Turner CH (2009) P2X7 nucleotide receptor plays an important role in callus remodeling during fracture repair. *Calcif Tissue Int* 84:405-412
 133. Liao Z, Seye CI, Weisman GA, Erb L (2007) The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *J Cell Sci* 120:1654-1662
 134. Linder S, Kopp P (2005) Podosomes at a glance. *J Cell Sci* 118:2079-2082
 135. Lipsky BP, Beals CR, Staunton DE (1998) Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK2. *J Biol Chem* 273:11709-11713
 136. Litvak V, Tian D, Shaul YD, Lev S (2000) Targeting of PYK2 to focal adhesions as a cellular mechanism for convergence between integrins and G protein-coupled receptor signaling cascades. *J Biol Chem* 275:32736-32746
 137. Liu D, Genetos DC, Shao Y, Geist DJ, Li J, Ke HZ, Turner CH, Duncan RL (2008) Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca(2+)- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone* 42:644- 652
 138. Lo SH (2006) Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol* 294:280-291
 139. Lu L, Oswald SJ, Ngu H, Yin FC (2008) Mechanical properties of actin stress fibers in living cells. *Biophys J* 95:6060-6071
 140. Luttrell DK, Luttrell LM (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23:7969-7978
 141. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. edn. Springer-Lehrbuch
 142. Maher PA (2000) Disruption of cell-substrate adhesion activates the protein tyrosine kinase pp60(c-src). *Exp Cell Res* 260:189-198
 143. McGeown JG (2010) Seeing is believing! Imaging Ca²⁺-signalling events in living cells. *Exp Physiol* 95:1049-1060
 144. Menter DG, Schilsky RL, DuBois RN (2010) Cyclooxygenase-2 and

cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward.
Clin Cancer Res 16:1384-1390

145. Miyamoto Y, Torii T, Yamamori N, Eguchi T, Nagao M, Nakamura K, Tanoue A, Yamauchi J (2012) Paxillin is the target of c-Jun N-terminal kinase in Schwann cells and regulates migration. Cell Signal 24:2061-2069
146. Morelli A, Chiozzi P, Chiesa A, Ferrari D, Sanz JM, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Olson MF, Di Virgilio F (2003) Extracellular ATP causes ROCK I- dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. Mol Biol Cell 14:2655-2664
147. Morrison MS, Turin L, King BF, Burnstock G, Arnett TR (1998) ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclasts. J Physiol 511 (Pt 2):495-500
148. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM (2006) *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. BMC Cancer 6:226
149. Munevar S, Wang Y, Dembo M (2001) Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. Biophys J 80:1744-1757
150. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M (2012) Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. Int J Cell Biol 2012:310616
151. Nakahama K (2010) Cellular communications in bone homeostasis and repair. Cell Mol Life Sci 67:4001-4009
152. Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM (1997) Bone biology. Baillieres Clin Endocrinol Metab 11:1-22
153. Nishii N, Nejime N, Yamauchi C, Yanai N, Shinozuka K, Nakabayashi T (2009) Effects of ATP on the intracellular calcium level in the osteoblastic TBR31-2 cell line. Biol Pharm Bull 32:18-23
154. Nobes CD, Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol 144:1235-1244
155. Oakes PW, Beckham Y, Stricker J, Gardel ML (2012) Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. J Cell Biol 196:363-374
156. Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR (2006)

Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation.
Bone 39:300-309

157. Ostrom RS, Gregorian C, Insel PA (2000) Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. J Biol Chem 275:11735-11739
158. Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ (2007) P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. J Biol Chem 282:3403-3412
159. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat Rev Mol Cell Biol 11:633-643
160. Pasapera AM, Schneider IC, Rericha E, Schlaepfer DD, Waterman CM (2010) Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. J Cell Biol 188:877-890
161. Patterson RL, van Rossum DB, Barrow RK, Snyder SH (2004) RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2328-2332
162. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. PLoS One 3:e2599
163. Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. J Cell Sci 120:3491-3499
164. Pines A, Romanello M, Cesaratto L, Damante G, Moro L, D'andrea P, Tell G (2003) Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line. Biochem J 373:815-824
165. Pribic J, Brazill D (2012) Paxillin phosphorylation and complexing with Erk and FAK are regulated by PLD activity in MDA-MB-231 cells. Cell Signal 24:1531-1540
166. Provenzano PP, Keely PJ (2011) Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. J Cell Sci 124:1195-1205
167. Qi J, Chi L, Wang J, Sumanasinghe R, Wall M, Tsuzaki M, Banes AJ (2009) Modulation of collagen gel compaction by extracellular ATP is MAPK and NF- κ B pathways dependent. Exp Cell Res 315:1990-

168. Rahman S, Bunning RA, Dobson PR, Evans DB, Chapman K, Jones TH, Brown BL, Russell RG (1992) Bradykinin stimulates the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 in human osteoblast-like cells. *Biochim Biophys Acta* 1135:97-102
169. Raisz LG (1999) Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 45:1353-1358
170. Rees DA, Charlton J, Ataliotis P, Woods A, Stones AJ, Bayley SA (1989) Myosin regulation and calcium transients in fibroblast shape change, attachment, and patching. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:112-122
171. Ridley AJ (2011) Life at the leading edge. *Cell* 145:1012-1022
172. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD (2001) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153:1175-1186
173. Romer LH, Birukov KG, Garcia JG (2006) Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res* 98:606-616
174. Rossow MJ, Sasaki JM, Digman MA, Gratton E (2010) Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nat Protoc* 5:1761-1774
175. Rottner K, Hall A, Small JV (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9:640-648
176. Rozengurt E (1998) Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol* 177:507- 517
177. Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213:589-602
178. Sakata A, Ohmori T, Nishimura S, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y (2014) Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thromb J* 12:1
179. Schaller MD, Parsons JT (1995) pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* 15:2635-2645
180. Schaller MD (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20:6459-6472

181. Schaller MD, Schaefer EM (2001) Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin. *Biochem J* 360:57-66
182. Scheswohl DM, Harrell JR, Rajfur Z, Gao G, Campbell SL, Schaller MD (2008) Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *J Mol Signal* 3:1
183. Schmenn T (2012) Zugkraftvergleichsanalyse von primären Osteoblasten und Osteosarkomzellen in Ruhe und nach mechanischer Belastung. Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik. Philipps-Universität Marburg
184. Schwartz MA (2010) Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a005066
185. Sen A, De Castro I, Defranco DB, Deng FM, Melamed J, Kapur P, Raj GV, Rossi R, Hammes SR (2012) Paxillin mediates extranuclear and intranuclear signaling in prostate cancer proliferation. *J Clin Invest* 122:2469-2481
186. Sen S, Kumar S (2009) Cell-Matrix De-Adhesion Dynamics Reflect Contractile Mechanics. *Cell Mol Bioeng* 2:218-230
187. Sen S, Kumar S (2010) Combining mechanical and optical approaches to dissect cellular mechanobiology. *J Biomech* 43:45-54
188. Sen S, Tewari M, Zajac A, Barton E, Sweeney HL, Discher DE (2011) Upregulation of paxillin and focal adhesion signaling follows Dystroglycan Complex deletions and promotes a hypertensive state of differentiation. *Eur J Cell Biol* 90:249-260
189. Shemesh T, Geiger B, Bershadsky AD, Kozlov MM (2005) Focal adhesions as mechanosensors: a physical mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12383-12388
190. Silber AS, Pfau B, Tan TW, Jacob R, Jones D, Meyer T (2012) Dynamic redistribution of paxillin in bovine osteoblasts stimulated with adenosine 5'- triphosphate. *J Mol Histol*
191. Smadja-Lamère N, Boulanger MC, Champagne C, Branton PE, Lavoie JN (2008) JNK-mediated phosphorylation of paxillin in adhesion assembly and tension-induced cell death by the adenovirus death factor E4orf4. *J Biol Chem* 283:34352-34364
192. Smith HS (2011) Painful osseous metastases. *Pain Physician* 14:E373-403

193. Snapp E (2005) Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. Curr Protoc Cell Biol Chapter 21:Unit 21.24
194. Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC (1998) Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. J Biol Chem 273:2653-2660
195. Soon Seng Ng CL, Vincent Chan (2011) Experimental and numerical determination of cellular traction force on polymeric hydrogels. Interface focus, pp 777-791
196. Spiering D, Hodgson L (2011) Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. Cell Adh Migr 5:170-180
197. Stricker J, Aratyn-Schaus Y, Oakes PW, Gardel ML (2011) Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions. Biophys J 100:2883-2893
198. Séror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saïdi H, Nardacci R, Voisin L, Paoletti A, Law F, Martins I, Amendola A, Abdul-Sater AA, Ciccocanti F, Delelis O, Niedergang F, Thierry S, Said-Sadier N, Lamaze C, Métivier D, Estaquier J, Fimia GM, Falasca L, Casetti R, Modjtahedi N, Kanellopoulos J, Mouscadet JF, Ojcius DM, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL (2011) Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. J Exp Med 208:1823-1834
199. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. Physiol Rev 79:1089-1125
200. Tan L, Meyer T, Pfau B, Hofmann T, Tan TW, Jones D (2010) Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation. J Musculoskelet Neuronal Interact 10:92-99
201. Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, Hemmings BA, Alexander RW, Griendling KK (2003) Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. Mol Cell Biol 23:8019-8029
202. Teranishi S, Kimura K, Nishida T (2009) Role of formation of an ERK-FAK-paxillin complex in migration of human corneal epithelial cells during wound closure *in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5646-5652
203. Tippmer S, Bossenmaier B, Häring H (1996) Bradykinin induces tyrosine phosphorylation in human foreskin fibroblasts and 293 cells transfected with rat B2 kinin receptor. Eur J Biochem 236:953-959

204. Tokuda H, Kotoyori J, Oiso Y, Kozawa O (1994) Intracellular signaling mechanism of bradykinin in osteoblast-like cells: comparison with prostaglandin E2. *Endocr J* 41:189-195
205. Tolic-Nørrelykke IM, Wang N (2003) Traction, Trypsin, and Tensegrity.
206. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150:797-806
207. Trache A, Meiningner GA (2008) Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 2:Unit 2A.2.1-2A.2.22
208. Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509- 544
209. Turner CE, Glenney JR, Burridge K (1990) Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* 111:1059-1068
210. Turner CE, Miller JT (1994) Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1583-1591
211. Turner CE (2000) Paxillin interactions. *J Cell Sci* 113 Pt 23:4139-4140
212. Turner Charles BD, Jee Web et al. (2004) Tribute to Harold M. Frost M.D., *J Musculoskel Neuron Interact* 2004; 4(4):348-356
213. Vadlamudi R, Adam L, Tseng B, Costa L, Kumar R (1999) Transcriptional up- regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 59:2843-2846
214. Vatsa A, Semeins CM, Smit TH, Klein-Nulend J (2008) Paxillin localisation in osteocytes--is it determined by the direction of loading? *Biochem Biophys Res Commun* 377:1019-1024
215. Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR (2003) P2X7 receptor- dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* 170:5728-5738
216. Vogel V (2006) Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:459-488

217. Wagstaff SC, Bowler WB, Gallagher JA, Hippskind RA (2000) Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c- fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 21:2175- 2181
218. Wang JH, Lin JS (2007) Cell traction force and measurement methods. *Biomech Model Mechanobiol* 6:361-371
219. Wang JW, Su W, Law YP, Lu CH, Chen YC, Wang JL, Chang HJ, Chen WC, Jan CR (2001) Mechanism of bradykinin-induced Ca(2+) mobilization in MG63 human osteosarcoma cells. *Horm Res* 55:265-270
220. Wang M, Kong Q, Gonzalez FA, Sun G, Erb L, Seye C, Weisman GA (2005) P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration. *J Neurochem* 95:630-640
221. Webb DJ, Brown CM, Horwitz AF (2003) Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr Opin Cell Biol* 15:614-620
222. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6:154-161
223. Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, González FA, Seye CI, Erb L (2005) Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol* 31:169-183
224. Wolfenson H, Henis YI, Geiger B, Bershadsky AD (2009) The heel and toe of the cell's foot: a multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:1017-1029
225. Wolfenson H, Lubelski A, Regev T, Klafater J, Henis YI, Geiger B (2009) A role for the juxtamembrane cytoplasm in the molecular dynamics of focal adhesions. *PLoS One* 4:e4304
226. Wolfenson H, Bershadsky A, Henis YI, Geiger B (2011) Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J Cell Sci* 124:1425- 1432
227. Wolff J (1892) *Das Gesetz der Transformation der Knochen.*, Hirsch-wild, Berlin
228. Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P (2008) Mechanical

stress induces osteopontin via ATP/P2Y1 in periodontal cells. J Dent Res 87:564- 568

229. Yamato M, Okuhara M, Karikusa F, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T (1999) Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsive polymer. J Biomed Mater Res 44:44-52
230. Yang HJ, Chen JZ, Zhang WL, Ding YQ (2010) Focal adhesion plaque associated cytoskeletons are involved in the invasion and metastasis of human colorectal carcinoma. Cancer Invest 28:127-134
231. Yang TT, Cheng L, Kain SR (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucleic Acids Res 24:4592-4593
232. Yang WH, Chang JT, Hsu SF, Li TM, Cho DY, Huang CY, Fong YC, Tang CH (2010) Bradykinin enhances cell migration in human chondrosarcoma cells through BK receptor signaling pathways. J Cell Biochem 109:82-92
233. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop Relat Res:275-294
234. Yu H, Ferrier J (1993) ATP induces an intracellular calcium pulse in osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 191:357-363
235. Yu H, Ferrier J (1994) Mechanisms of ATP-induced Ca²⁺ signaling in osteoclasts. Cell Signal 6:905-914
236. Yu HS, Lin TH, Tang CH (2012) Bradykinin enhances cell migration in human prostate cancer cells through B2 receptor/PKC δ /c-Src dependent signaling pathway. Prostate
237. Yu J, Prado GN, Taylor L, Pal-Ghosh R, Polgar P (2002) Hybrid formation between the intracellular faces of the bradykinin B2 and angiotensin II AT1 receptors and signal transduction. Int Immunopharmacol 2:1807-1822
238. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. J Cell Sci 116:4605-4613
239. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. Nat Cell Biol 9:858-867

- 240. Zaidel-Bar R, Milo R, Kam Z, Geiger B (2007) A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 120:137-148
- 241. Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1655-1669
- 242. Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114:3583-3590
- 243. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD (1991) Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112:279- 288
- 244. Zimerman B, Volberg T, Geiger B (2004) Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 58:143-159

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

ACTH Adrenocorticotropes Hormon

ADP Adenosin-5'-Diphosphat

AFM Atomic Force Microscopy

AMP Adenosin-5'-Monophosphat

ARF Adenosyl-Ribosylierungsfaktor, Familie der kleinen GTPasen

ATP Adenosin-5'-Triphosphat

B1/2 Membranrezeptoren für Bradykinin

BMP Bone Morphogenetic Protein

Ca²⁺ intrazelluläres freies Kalzium

CamK2 Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein Kinase II

C-AMP zyklisches Adenosin-5'-Monosulfat

CCD charged-coupled device sensor

Cdc42 homologes Protein zum Gen 42 (cell division cycle gen 42)

Cdk5 cyclin dependent kinase 5

c-DNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

c-Fos zelluläres proto-Onkogen; Transkriptionsfaktor

c-GMP zyklisches Guanosin-5'-Monophosphat

CTF Cell Traction Force

Da Dalton

DAG Diacylglycerin

DMSO Dimethylsulfoxid

EC₅₀ mittlere effektive Konzentration zum Erreichen eines halbmaximalen Effekts

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGF Epidermal Growth Factor

E_{max} maximale Exstinktion

ERK extracellular regulated kinase; Typ 1 und 2

EZM Extrazelluläre Matrix

API 4', 6-Diamidin-2-Phenylindol

F-Aktin fibrilläres Aktin

FA Fokaler Adhäsionskontakt (Focal Adhesion)

FAK Focal Adhesion Kinase

FAT Focal Adhesion Kinase targeting Domain

FCS fötales Kälberserum

FRAP Fluorescence Recovery After Photo-bleaching

FTTC Fourier Transform Traction Cytometry

GAP GTPase activating protein

GDI guanine-nucleotide dissociation inhibitor

GDP Guanindiphosphat

GEF guanine-nucleotide exchange factor

eGFP enhanced green fluorescent protein

GIT 1/2 ARF GTPase-activating protein GIT2

GPCR G-Protein gekoppelter Rezeptor

Grb2 growth factor receptor bound protein-2

GTP Guanintriphosphat

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cells;

Ig Immunglobulin

IGF Insulin like Growth Factor

IL Interleukin

IP₃ Inositol-1, 4, 5-trisphosphat

JaK Januskinase

JNK c-Jun-Kinase

k kilo

LD Proteindomäne beginnend mit Leuzin-Aspartat und 8 α -Helices; Interaktionsziel von Bindeproteinen für Protein-Proteininteraktion

LIM Zinkfinger aufweisende, cystinreiche Proteindomäne für Protein-Proteininteraktion, benannt nach den ersten Transkriptionsfaktoren mit einer solchen Domäne Lin-1, Isl-1, Mec-3

LPA lysophosphatidic acid

M molar, mol/l
MAP-K mitogen activated protein kinase
M-CSF Macrophage colony-stimulating factor
MG63-Zellen humane Osteosarkomzellen
min Minute
MLCK myosin light chain kinase
mRNA messenger RNA
NaOH Natriumhydroxid
NFκB nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO Stickstoffmonoxid
NPP nucleotide pyrophosphatase
P phosphoryliert
P2Y purinerge G-Protein gekoppelter Rezeptor
P2X purinerge Ionenkanalgekoppelter Rezeptor
PAK p21-activated Proteinkinase
Pax FA-Gerüstprotein Paxillin
PBS Phosphate-buffered salt buffer
PDGF Platelet-derived growth factor
PGE₂ Prostaglandin E₂
Pi3K Phosphoinositid 3-Kinase
PKA c-AMP-abhängige Proteinkinase
PKC Proteinkinase C
PLA₂ Phospholipase 2
PLC Phospholipase C
PLD Phospholipase D
pOB primäre Osteoblast(en)
PTP Proteintyrosinphosphatase
PyK2 zytoplasmatische Proteintyrosinkinase 2 der FAK-Familie
-R Rezeptor
Rac Mitglied der Ras Familie
RACK1 receptor for activated C kinase RACK1 [55, 161]
Raf eine MAP-KKK

RANK Receptor activator of NFκB

RANKL Receptor activator of NFκB - Ligand

Rap1 Ras-related protein 1, kleine GTPase

Ratio F_{340}/F_{380} -Ratio zur Bestimmung der Kalziumkonzentration

Ratio_{max} gemittelte maximale F_{340}/F_{380} Ratio nach Aktivator-Zugabe

RFP Red fluorescent protein

RGD extrazelluläre Proteinsequenz von Plasmamembranproteinen mit Arg-Gly-Asp- Sequenz, oder im Buchstabencode RGD

Riam Rap1-GTP-interacting adapter molecule

RNA ribonucleic acid

ROCK Rho-associated, coiled-coil-forming protein kinase

RTK Rezeptor-Tyrosinkinase

Runx2 Transkriptionsfaktor in der Osteoblastendifferenzierung

s Sekunde

SDS Natriumlaurylsulfat (Sodium-dodecylsulfat)

S Serinrest eines Proteins als Phosphorylierungsstelle

SF Stressfaser(n)

SH2, SH3 Src homology domain 2, -3

Shc Src homology 2 domain containing transforming protein 1

SIN Standard-I-Nährbouillon (Kulturmedium)

Src c-Src Tyrosinkinase

STAT signal transducer and activator of transcription

t_{1/2} Halbwertszeit

TEMED Tetramethylethyldiamin

TF Traction Force

Tiam1 Rac GTP exchange factor

TIRF total internal reflection fluorescence microscopy

TNFα Tumornekrosefaktor α

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

t-RNA Transfer-Ribonukleinsäure

Tyr Tyrosinrest eines Proteins

TRPF Traction reconstruction with point forces

Upm Umdrehungen pro Minute

UTP Uridin-5'-Triphosphat

UV Ultraviolett

Wasp Wiskott-Aldrich- Syndrome Protein, bindet Arp2/3 zur Aktinpolymerisierung

w/o without; ohne

YFP yellow fluorescent protein

8.2 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 19.04.1989 in Speyer, Rheinland-Pfalz

Studium und Schule:

Ab 01/02/2015 Assistenzärztin in der Viszeralchirurgie in Bad Soden

12/2014 2.Staats-Examen Humanmedizin; Note 1,3

10/2007 - 07/2014 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität
Marburg

08/2005 - 08/2007 Sevenoaks School in Kent, England mit International
Baccalaureate 45 Punkte - entspricht Abiturschnitt 1,0

08/1999 - 06/2005 Gymnasium am Kaiserdom in Speyer

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Adamkiewicz, Aigner, Albert, AlFakhri, Alfke, Alter, Arabin, Arndt, Arweiler, Bals, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Bette, Bien, Blaser, Bohlander, Bösner, Brandt, Braulke, Braun, Braune, Braunecker, Brehm, Burbelko, Burchert, Cetin, Cordes, Czubayko, Dauch, Daut, Decher, Deichert, Del- Rey, Dette, Dettmeyer, Diek, Dietz, DiFazio, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Duck- witz, Duda, Eberhard, Efe, Eickmann, Eilers, ElZayat, Egenhart, Fendrich, Feuser, Folz, Fuchs-Winkelmann, Gehling, Geks, Gemsa, Görg, Graf, Graz, Gress, Groß, Grundmann, Haberhausen, Hauk, Hertl, Heverhagen, Hilt, Hinterseher, Hofer, Holst, Hoyer, Hundt, Jacob, Jaques, Jerrentrup, Jones, Kalder, Kamp-Becker, Kann, Ka- rakas, Kinscherf, Kircher, Klose, Koczulla, Köhler, Koolman, Krol, Kühnert, Kuhnt, Kunsch, Leonhardt, Lill, Lingenfelder, Loebel, Löffler, Lübbe, Lüers, Maier, Maisch, Maisner, Manek, Meyer, Michl, Milani, Moll, Möller, Moosdorf, Morin, Mueller, Neff, Neubauer, Nimsky, Ocker, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Pfingsten, Plant, Preisig-Müller, Pressel, Ramaswamy, Rausch, Reinartz, Renz, Richter, Rier- aKnorrenschild, Rinné, Ritter, Röhm, Ruchholtz, Ruppert, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schulze, Schunk, Schütz, Schwarting, Seifart, Seitz, Sekundo, Serzisko, Sesterhenn, Sevinc, Steiniger, Stiewe, Straube, Suske, Tackenberg, Teymoortash, Theisen, Thum, Torossian, Toussaint, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wester- mann, Wilke, Wollmer, Wulf, Zemlin, Zettl, Zimmermann, Zippel, Zoremba, Zovko;

8.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Jones für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Gelegenheit zum selbstständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. mult. Thomas Meyer danke ich für anregende wissenschaftliche Diskussionen und seine hilfsbereite Beratung. Besonders dankbar bin ich für sein Koreferat sowie für die engagierte Zusammenarbeit, die zur Publikation zum Thema dieser Dissertation führte.

Große Dankbarkeit gilt den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Orthopädie, die mich warmherzig betreuten und in der experimentellen Arbeit anleiteten. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Tho Weng Tan, der mich mit Rat und Tat im Labor unterstützte.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mich im gesamten Entstehungsprozess der Dissertation seelisch und finanziell unterstützt haben. Danke, dass ihr immer hinter mir steht!

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Stefan Thörner für die Beratung bei der statistischen Daten-Analyse, bei Bastian Pfau für seine Unterstützung bei der Datenaufbereitung, bei dem Institut für Zytobiologie der Universität Marburg, deren Geräte ich nach freundlicher Einweisung von Dr. Sophie Veitinger benutzen durfte, bei Patrick Munro und all denen, die mich während dem Entstehen dieser Dissertation durch Korrekturvorschläge, konstruktive Kritik oder Motivation unterstützt haben.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Paxillin in ATP- und Bradykinin-stimulierten primären bovinen Osteoblasten

im Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Prof. Dr. David B. Jones mit Unterstützung durch Prof. Dr. Thomas Meyer und Tho Weng Tan ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in Erst-Autorenschaft unter dem Titel "Dynamic redistribution of Paxillin in bovine osteoblasts stimulated with adenosine 5'-triphosphate" im Journal of Molecular Histology veröffentlicht [Referenz 221].

Ort, Datum, Unterschrift